Disbui, Düsseldorf
1985
Körholz, Dieter

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der
Abteilung für Neonatologie und Gastroenterologie
Leiter: Prof. Dr. E. Schmidt
und der
Abteilung für Hämatologie und Onkologie
Leiter: Prof. Dr. U. Göbel
Zentrum für Kinderheilkunde der Universität Düsseldorf

# Nachweis von Antikörpern gegen l-Asparaginase und spezifischen Immunkomplexen bei 22 Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie

Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Dieter Körholz
1985

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

gez.

| | |
|---|---|
| Dekan: | Prof. Dr. A. Hopf |
| Referent: | Prof. Dr. V. Wahn |
| Koreferent: | Prof. Dr. H. Zeidler |

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung:

1. Historischer Überblick über die Einführung der l-Asparaginase in die Behandlung maligner Lymphome 1
2. Chemischer Aufbau der l-Asparaginase 2
3. Wirkungsmechanismus der l-Asparaginase 3
4. Nebenwirkungen der l-Asparaginasetherapie 4
5. Pharmakokinetik der l-Asparaginase 8
6. Antikörper, Komplementsystem und Immunkomplexe 9
6.1. Antikörper 9
6.2. Komplementsystem 11
6.3. Immunkomplexe 15
7. Fragestellung 17

II. Patientengut und Methodik:

1. Patientengut und Probengewinnung 18
1.1. Patientengut 18
1.2. Probengewinnung 21
2. Erstellung der Normalbereiche und der Statistiken 21
3. Enzymatische Messung der l-Asparaginase-Aktivität 21
4. Messung des l-Asparaginase-Antigens 26
5. Proteinbestimmung nach Lowry 28
6. Präparation von $F(ab)_2$-Fragmenten 28
6.1. Gewinnung spezifischer Anti-l-Asparaginase-IgG-Antikörper vom Kaninchen 30
6.2. Herstellung der $F(ab)_2$-Fragmente 32
6.3. Reinigung der $F(ab)_2$-Fragmente 32
7. Solid Phase ELISA Teste 35
8. Bestimmung spezifischer Anti-l-Asparaginase-IgG und IgM-Antikörper in den Seren der Patienten mittels solid phase ELISA 38

8.1. Reagentien 38
8.2. Durchführung der Teste 38
8.3. Auswertung 39
8.4. Standardisierung der alkalische Phosphatase-konjugierten Antikörper 39
8.5. Standardisierung der l-Asparaginase-Konzentration 41
9. Bestimmung l-Asparaginase-enthaltender IgG-Immunkomplexe mittels solid phase ELISA 41
9.1. Durchführung des Testes 41
9.2. Standardisierung l-Asparaginase-spezifischer $F(ab)_2$-Fragmente 42
9.3. Erstellung der Standardkurve 42
9.4. Messung experimentell hergestellter, l-Asparaginase-enthaltender Immunkomplexe beim Menschen 43
10. Bestimmung C3b-bindender IgG-Immunkomplexe mittels solid phase ELISA 44
10.1. Durchführung des Testes 44
10.2. Standardisierung der Anti-Human-C3 $F(ab)_2$-Fragmente 44
10.3. Herstellung von aggregiertem Humanglobulin 45
10.4. Erstellung der Standardkurve 45
11. Messung PEG-präzipitabler IgG-Immunkomplexe 46
11.1. Durchführung des Testes 46
11.2. Prüfung der Testbedingungen 46
12. Bestimmung spezifischer Anti-l-Asparaginase-IgE-Antikörper 47
12.1. Testprinzip 47
12.2. Reagentien 49
12.3. Durchführung des Testes 49
12.4. Erstellung der Standardkurve 50
13. In vitro Experimente 51
13.1. Nachweis der Spezifizität des Testes zur Bestimmung l-Asparaginase-enthaltender Immunkomplexe 51
14. Vergleichende Untersuchungen an vier verschiedenen l-Asparaginase-Präparationen 53

III. Resultate:

A. Untersuchungen zu methodischen Problemen 55

1. Funktionelle l-Asparaginasebestimmung 55
2. ELISA Test zur Messung von l-Asparaginase-enthaltenden IgG-Immunkomplexen 58
2.1. Nachweis der Spezifizität 58
2.2. Nachweisbarkeit löslicher Immunkomplexe bei unterschiedlichen Antigen-Antikörper-Relationen 58
2.3. Reproduzierbarkeit des Testes 58
3. PEG-präzipitable Immunkomplexe 64

B. Ergebnisse der Untersuchungen an Patienten 66

1. Spezifische Antikörper gegen l-Asparaginase 66
2. Ergebnisse der Immunkomplexuntersuchungen 70
3. Beziehung zwischen spezifischen IgG-Anti-l-Asparaginase-Antikörpern, l-Asparaginase-enthaltenden IgG-Immunkomplexen und der Elimination von l-Asparaginase 75
4. Möglicher Zusammenhang zwischen Anti-l-Asparaginase-IgG-Antikörpern und den Remissionszeiten der Patienten 79
5. Allergische Reaktionen auf l-Asparaginase - Risikoabschätzung und Möglichkeiten zur Verhütung 84

IV. Diskussion:

A. Diskussion methodischer Probleme 94

1. l-Asparaginase in der heutigen Tumortherapie 94
2. ELISA Test zum Nachweis l-Asparaginase-enthaltender IgG-Immunkomplexe 95
3. PEG-präzipitable IgG Immunkomplexe 95

B. Diskussion der klinischen Ergebnisse

1. Bildung spezifischer Antikörper gegen l-Asparaginase 96
2. Bildung von Immunkomplexen unter der l-Asparaginase-Behandlung 98
3. Zusammenhang zwischen den immunogenen Eigenschaften der l-Asparaginase und ihrer Wirksamkeit 101
4. Allergische Reaktionen auf die Gabe von l-Asparaginase 103

V. Zusammenfassung 109

VI. Laudatio 111

VII. Literaturverzeichnis 112

VIII. Lebenslauf 124

# I. Einleitung

## 1. Historischer Überblick über die Einführung der l-Asparaginase in die Behandlung maligner Lymphome

Der erfolgreiche Weg der l-Asparaginase in der Behandlung maligner Lymphome begann Anfang der fünfziger Jahre mit der Entdeckung von Kidd und seinen Mitarbeitern (Kidd et al., 1953), daß bestimmte Lymphomzellen unter dem Einfluß von Meerschweinchenserum nicht wuchsen. Sie implantierten Mäusen Gardeners Lymphomzellen, Zellen des sogenannten 6C3HED Lymphoms. Durch die Behandlung der Tiere mit Anti-6C3HED-Antiserum vom Kaninchen, das mit Meerschweinchenkomplement angereichert worden war, wurde das Wachstum der Lymphome inhibiert. Durch die alleinige Behandlung der Mäuse mit Meerschweinchenserum wurde der gleiche Effekt erzielt. Allerdings konnte mit dem Serum von z.B. Hund, Katze, Kaninchen, Ratte oder Pferd keine tumorinhibierende Wirkung induziert werden. Auch konnte sie nur für einige Lymphomarten nachgewiesen werden (Kidd, 1953 I). Interessanterweise konnte keine Wirkung bei in vitro Experimenten erzielt werden. Aus diesen Befunden schloß Kidd, daß im Meerschweinchenserum eine noch nicht identifizierte Komponente sei, die nicht toxisch, sondern über Veränderungen im tumortragenden Organismus zu einer Beeinflussung des Tumorwachstums führen müsse (Kidd, 1953 II).

Bei der Suche nach dem für die gemachten Beobachtungen verantwortlichen Wirkstoff, gelang es Broome und seinen Mitarbeitern l-Asparaginase als diese Substanz zu identifizieren (Broome, 1961 und 1963). Er besann sich auf eine Beobachtung von Clementi aus dem Jahre 1922, daß in Meerschweichenserum im Vergleich zu anderen Tierarten ein sehr hoher Gehalt an l-Asparaginase enthalten ist.

Ein weiterer Meilenstein in der Geschichte der l-Asparaginase war die Entwicklung gereinigter l-Asparaginase aus E.coli Kulturen, für die von Mashburn und Wriston (1964) ebenfalls eine cytostatische Wirkung bestätigt werden konnte. Diese Untersuchungen basierten auf der von Tsuji et al. (1959) veröffentlichten Erkentnis, daß in E.coli eine hohe l-Asparaginase-Aktivität gefunden werden kann. Durch diese Herstellungsmethode war es möglich, l-Asparaginase in weit größerem Umfang produzieren zu können. Nachdem Öttgen 1967 die Wirksamkeit dieses Enzymes in vivo bestätigen konnte, hat die l-Asparaginase ihren festen Platz in der Behandlung menschlicher Leukämien.

Da l-Asparaginase bis zum heutigen Tage das einzige Medikament in der Behandlung maligner Erkrankungen ist, daß spezifisch gegen Tumorzellen wirkt, ist es auch weiterhin Gegenstand umfangreicher Forschungen. So fanden Wehinger et al. (1981) bei Kindern, die an einer ALL erkrankt waren und mit l-Asparaginase behandelt wurden, deutlich mehr Remissionen als in der Vergleichsgruppe. Andererseits berichteten Holland et al. (1981), daß durch l-Asparaginase nicht die Zahl, wohl aber die Dauer der Remissionszeiten gesteigert werden könnte. Gleichzeitig konnte in dieser Untersuchung eine Verstärkung der l-Asparaginase-Wirksamkeit bei Kombination mit z.B. Vincristin bzw. Prednison nachgewiesen werden (Bierling, 1970, Burchenal, 1975).

Trotz durchaus vorhandener Nebenwirkungen, auf die im folgenden noch eingegangen werden soll, wird diesem Medikament auf Grund seiner spezifischen Wirksamkeit auch in den kommenden Jahre weiterhin erhebliche Bedeutung in der Behandlung von Leukosen beizumessen sein.

## 2. Chemischer Aufbau der l-Asparaginase

Bei der Untersuchung verschiedener l-Asparaginase-Präparationen aus E.coli fanden Irion et al. (1970) drei verschiedene Isoenzyme

mit unterschiedlicher spezifischer Aktivität und unterschiedlichem Molekulargewicht. Zwischen den Präparaten, die von verschiedenen E.coli Stämmen gewonnen worden waren, bestehen nur geringe Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung der Isoenzyme. Bei der säulenchromatographischen Auftrennung der l-Asparaginase fanden diese Autoren den größten Teil der l-Asparaginase-Aktivität in einem Bereich von 120 Kilo Dalton (KD). Die spezifische Aktivität der anderen Isoenzyme (zusammen ca. 20% des Proteins), die z.T. ein deutlich höheres Molekulargewicht als 240 KD hatten, war geringer. Nach Säurespaltung ist in allen l-Asparaginase-Präparationen nur noch eine Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 22 KD nachzuweisen (Whelan et al., 1969).

Bemerkenswert ist darüberhinaus noch, daß in allen untersuchten l-Asparaginase-Präparationen neben der eigentlichen Enzymaktivität noch eine geringe, aber nicht abtrennbare l-Glutaminase-Aktivität gefunden werden kann. Ihr Anteil an der Gesamtaktivität liegt ziemlich konstant zwischen 3 und 5%. Aus diesen Beobachtungen schlossen Campbell et al.(1969) und Irion et al. (1970), daß es sich hierbei nicht um eine Verunreinigung, sondern um eine unspezifische Reaktivität des aktiven Zentrum der l-Asparaginase handelt.

## 3. Wirkungsmechanismus der l-Asparaginase

Broome konnte in seinen Untersuchungen (1963 III) zeigen, daß die Anti-Lymphomwirkung der l-Asparaginase in einer Erniedrigung der extrazellulären Konzentration an l-Asparagin begründet liegt. Durch diese Beobachtung wird auch erklärt, daß nur solche Tumorzellen durch l-Asparaginase im Wachstum gehemmt werden, für die l-Asparagin eine essentielle Aminosäure darstellt, d.h. für die Proteinsynthese, die für das Zellwachstum und die Vitalität notwendig ist, sind diese Zellen auf die Zufuhr von l-Asparagin angewiesen. Desweiteren konnte Broome in dieser Arbeit zeigen, daß Lymphomzellen nach Züchtung in l-Asparagin-freiem Medium durch Mutation die Fähigkeit zur l-Asparaginproduktion erlangen

können, wodurch sie gegen eine l-Asparaginasebehandlung resistent werden. Neben dieser spezifischen Wirkung von l-Asparaginase auf Tumorzellen wurde von verschiedenen Autoren auch über immunsuppressive Wirkungen des Enzyms berichtet. Chakrabarty et al. (1970) fanden eine solche negative Beeinflussung sowohl in der humoralen, wie auch der zellulären Abwehr. Sie stellten die Theorie auf, daß diese Wirkungen durch Beeinflussung der an diesen Vorgängen beteiligten Zellen zustande kommt.Die bei diesen Untersuchungen verwendeten l-Asparaginase-Konzentrationen liegen in dem heute auch in der Tumortherapie benutzten Bereich. Darüberhinaus sind aber auch noch weitere immunsuppressive Wirkungen beschrieben worden. So fanden Lauenstein et al. (1970) eine verzögerte Transplantatabstoßung unter l-Asparaginaseeinfluß. Schäffner ermittelte eine verminderte Antwort auf die Stimulation mit spezifischen Antigenen (Schäffner et al., 1977).

## 4. Nebenwirkungen der l-Asparaginase-Behandlung

Bei der Behandlung mit l-Asparaginase müssen zwei Gruppen von Begleiterscheinungen unterschieden werden: toxische Effekte und allergische Reaktionen.

Toxische Wirkungen, wie sie von Carbone et al. (1970) und Loeb et al. (1970) beschrieben wurden, manifestieren sich besonders an Gehirn, Leber, Pankreas und Gastrointestinaltrakt. Im einzelnen wurden folgende Nebenwirkungen beobachtet:

Sehr oft werden cerebrale Verwirrtheit (besonders bei erwachsenen Patienten) und Unverträglichkeiten im Gastrointestinaltrakt, wie Übelkeit, Erbrechen und Meteorismus beschrieben.

Veränderungen der Leberfunktion gehen im allgemeinen mit einer Erhöhung der alkalischen Phosphatase und der Transaminasen einher. In einzelnen Fällen kam es auch zu einer toxischen Hepatitis mit fettiger Leberdegeneration. Als Ausdruck einer gestörten Leberfunktion sind Veränderungen im Gerinnungssystem

zu bewerten, die in 1-2% zu lebensbedrohlichen Komplikationen führten (Deutsch et al., 1970, Ramsay et al., 1977).

Auch bei einer Beeinträchtigung der Pankreasfunktion muß zwischen leichten, reversiblen und schweren, sehr seltenen Nebenwirkungen unterschieden werden. Unter der Behandlung mit l-Asparaginase entstehende Hyperglykämien werden von Carpentieri et al. (1978) mit dem Rückgang der Insulinproduktion erklärt. Sehr selten einmal kann es zu einer Pankreatitis kommen, die dosisunabhängig, wenige Tage nach der Behandlung auftritt und als nekrotisierende Pankreatitis letal verlaufen kann. Da diese Nebenwirkungen auf Verunreinigungen der l-Asparaginase-Präparationen zurückgeführt werden konnten, wie sie in den heutigen Präparaten nicht mehr enthalten sind (Hamilton- Fairley et al., 1970), scheinen diese von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Nierenfunktionsstörungen wurden lediglich im Zusammenhang mit einem gesteigerten Zellabbau und der hieraus resultierenden erhöhten Harnsäurefreisetzung beobachtet.

Der wesentliche Vorteil der l-Asparaginase gegenüber den meisten Chemotherapeutika liegt in ihrer spezifischen Wirksamkeit und der damit verbundenen geringen Knochenmarkstoxzizät.

Die zweite Gruppe unerwünschter Effekte bei der Behandlung mit l-Asparaginase ergibt sich aus der Tatsache, daß dieses Medikament als Fremdprotein im menschlichen Organismus trotz immunsuppressiver Wirkungen auch immunogen aktiv ist. Hierdurch wird die Bildung spezifischer Antikörper angeregt. Im Antagonismus von Immunsuppression und Immunogenität scheint bei den in der Lymphomtherapie üblichen Dosen letztere zu überwiegen (Maral et al., 1972). Durch die Kombination mit anderen immunsuppressiven Medikamenten kann diese Wirkung allerdings zur anderen Seite hin verschoben werden. So konnte die Zahl anaphylaktischer Reaktionen bei den behandelten Patienten durch die gleichzeitige Applikation von Vincristin und Prednison erheblich gesenkt werden. Die Toxizität einer solchen Kombination ist allerdings wesentlich höher.

UNIV. LEIDEN KIN.

Die Gabe von einer intravenös verabreichten Testdosis ist zur Vorhersage von allergischen Reaktionen ebenfalls nicht geeignet, da nur 1/7 Patienten mit einer anaphylaktischen Reaktion auf l-Asparaginase hierauf schon reagieren. Eine andere Möglichkeit allergische Reaktionen zu verhindern, scheint die intramuskuläre Applikation von l-Asparaginase zu sein (Nesbit et al., 1979). Allerdings sprechen die Beobachtungen von Spiegel et al. (1980) eher dafür, daß bei dieser Anwendungsart die Reaktionen nur verzögert eintreten, so daß eine längere Überwachung der Patienten nach der l-Asparaginase-Gabe notwendig ist.

Bis vor kurzem war der Mechanismus der allergischen Reaktionen unklar. Es wurde lediglich eine Beziehung zwischen dem Auftreten allergischer Symptome und dem Nachweis von spezifischen Antikörpern konstatiert (Khan et al., 1969, Petersen et al., 1971). Im wesentlichen wurden bivalente Antikörper vorzugsweise der IgG Klasse gefunden. In einigen Fällen konnten auch IgE Antikörper nachgewiesen werden. Ihre Bedeutung für anaphylaktische Reaktionen wurde als unbedeutend eingestuft (Killander et al., 1976). Trotz einiger Versuche mittels der Analyse von Anti-Asparaginase spezifischen Antikörpern eine Prädiktion allergischer Reaktionen zu erreichen (Elhag et al., 1977), konnte bisher keine eindeutige Korrelation gefunden werden (Dellinger et al., 1976). Erst durch die Untersuchungen von Fabry et al. (1985) konnte dieses Ziel mittels eines neuen, sehr empfindlichen ELISA Testes erreicht werden. Außerdem gelang es dieser Arbeitsgruppe, den Mechanismus der Reaktionen in der überwiegenden Anzahl der Fälle (7/8) auf eine Aktivierung des klassischen Komplementweges zurückzuführen. Die Patienten hatten vor den Infusionen deutlich erhöhte IgG bzw. IgM Antikörperspiegel gegen l-Asparaginase. Unter der Infusion konnte eine deutliche Titerreduktion verzeichnet werden.

Neben der Beteiligung an allergischen Reaktionen scheint die Bedeutung der spezifischen Antikörper auch Einfluß auf die Elimination des Enzyms zu haben. In Gegenwart der Antikörper stellten verschiedene Autoren eine Inaktivierung der l-Asparaginase fest. Dieses kann neben der erlernten Fähigkeit von Lymphomzellen zur

intrazellulären l-Asparaginsynthese (Canellos et al., 1969) ein weiterer Mechanismus bei der Resistenzentwicklung sein (Vadlamudi et al., 1971, Khan et al., 1969, Dohlwitz et al., 1970).

Im Zusammenhang mit dem Auftreten allergischer Reaktionen auf die Gabe von l-Asparaginase müssen noch zwei weitere Bemerkungen gemacht werden:

Erfreulicherweise sind alle bisher beschriebenen Reaktionen auf l- Asparaginase vergleichsweise milde verlaufen. Es kam nur zu Blässe, Übelkeit und in einigen Fällen auch zum Kreislaufkollaps. Über Todesfälle im Zusammenhang mit diesen Reaktionen ist bisher nichts bekannt geworden. Allerdings konnten in einigen Studien bei bis zu 33% der Patienten solche allergischen Reaktionen gesehen werden. Bei diesen Patienten konnte die Behandlung mit l-Asparaginase nur mit einer anderen Präparation z.B. Erwinia Asparaginase fortgesetzt werden. Allerdings bestehen zwischen E.coli und Erwinia Aparaginase Kreuzreaktivitäten, so daß es nicht überrascht, daß einige Patienten auch nach dem Präparatewechsel allergisch reagierten (Killander et al., 1976, Khan et al., 1969, Hamilton-Fairley, 1970, Dellinger et al., 1976). Neuerdings besteht die Möglichkeit, dieses Problem auf sehr elegante Weise zu umgehen. Durch die Behandlung der l-Asparaginase mit aktiviertem Polyethylenglykol können die antigenen Gruppen im Asparaginasemolekül mit geringem Aktivitätsverlust maskiert werden, so daß diese Präparationen nicht nur weniger immunogen sind, sondern von spezifischen Antikörpern auch schlechter erkannt werden können. Hierdurch ist die Bildung von Immunkomplexen, die zu einer Aktivierung des klassischen Komplementweges führen, eingeschränkt (Abuchowski et al., 1984).

Eine weitere wesentliche Beobachtung, die im Zusammenhang mit allergischen Reaktionen auf l-Asparaginase gemacht wurde, steht im Widerspruch zu der Beobachtung, daß das Enzym durch Antikörper inaktiviert wird. So fanden Killander et al. (1976) bei ihren Patienten in Anwesenheit spezifischer, bivalenter Antikörper vermehrt Remissionen. Eine Klärung dieses offensichtlichen Widerspruches soll in dieser Arbeit versucht werden.

## 5. Pharmakokinetik der l-Asparaginase:

Nach intravenöser Applikation verteilt sich l-Asparaginase im Extrazellulärraum; später ist sie in fast allen Organen und Geweben mit Ausnahme des Gehirns nachzuweisen (Pütter et al., 1969). Der Eliminationsweg der l-Asparaginase ist unklar, sicher ist nur, daß keine Ausscheidung über die Niere erfolgt. Auch eine Elimination über die Lymphwege ist wenig wahrscheinlich, da in diesem Gewebe in tierexperimentellen Untersuchungen nur ein Teil der rechnerisch ermittelten Konzentrationen gefunden werden konnte (Hall et al., 1970, Pütter et al., 1970). Es wurde diskutiert, daß l-Asparaginase (l-Asp) das Kapillarendothel durchdringt und so vom RES aufgenommen werden kann (Hall et al., 1970). Da Erwinia Asp zur Aggregatbildung neigt, soll diese Fähigkeit für E.coli Asp besser ausgeprägt sein. Erstaunlicherweise gibt derselbe Autor für Erwinia Asp eine wesentlich kürzere Halbwertszeit an.

Die Elimination der l-Asp folgt einer Kinetik erster Ordnung (Pütter et al., 1969).Die in der Literatur angegebenen Halbwertszeiten der l-Asp differieren erheblich. Einige Autoren weisen auch darauf hin, daß die Halbwertszeit vom untersuchten Präparat abhängig sei (Irion et al., 1970, Mashburn und Landin, 1970, Pütter et al., 1969). Letztgenannter Autor fand bei der Analyse von Crasnitin und Asp X von Bayer für das erste Präparat eine Halbwertszeit von 12 Stunden und für das zweite von 24 Stunden. Nur bei letzterem konnte bei täglicher Gabe eine Akkumulation festgestellt werden.Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Befunde von Mashburn et al., die eine Abhängigkeit der Eliminationszeit von dem isoelektrischen Punkt des untersuchten Präparates fanden. Die Halbwertszeit war umso geringer, je niedriger der Isoelektrische Punkt (IP) lag. Die an unserer Klinik verwendete l-Asp hat eine mittlere Halbwertszeit von 11,2 + 2,7 Stunden (Schwartz et al., 1970). In tierexperimentellen Untersuchungen fanden Pütter et al. (1969) bei wiederholter Gabe von l-Asp verkürzte Halbwertszeiten, die sie im Zusammenhang mit der Bildung spezifischer Antikörper sahen.

## 6. Antikörper, Komplementsystem, Immunkomplexe:

In dem bisherigen Teil dieser Einleitung habe ich mich mit dem untersuchten Präparat auseinandergesetzt. Es wurden neben der Bildung von spezifischen Antikörpern auf l-Asp auch das Vorkommen allergischer Reaktionen erörtert. Hierbei spielen neben Antikörpern, das Komplementsystem und spezifische bzw. unspezifische Immunkomplexe eine wesentliche Rolle, wie es im weiteren noch ausführlich dargelegt werden soll. Deshalb sollen diese Grundbegriffe der Immunologie im folgenden näher beschrieben werden.

### 6. 1. Antikörper:

Man teilt das Immunsystem der höheren Säugetiere in humorale und zelluläre Immunreaktionen ein. Diese werden in ihren Aufgaben von einigen Effektorsystemen, wie z. B. dem Komplementsystem, Kininsystem und dem Gerinnungssystem unterstützt.

Den wesentliche Träger des humoralen Immunsystem stellen die Antikörper dar. Sie werden beim Menschen nach Kontakt mit einem Antigen in Plasmazellen, den Effektorzellen der B-Lymphozyten, gebildet. Ihre Hauptfunktion besteht in der Bindung der Antigene. Mit diesen vereinigen sie sich zu einem Immunkomplex. Über den Fc-Teil in ihrem Molekül können sie u.a. das Komplementsystem aktivieren oder an Makrophagen binden, wodurch die Clearance solcher Komplexe gesteigert und die Antigenelimination beschleunigt wird.

Beim Menschen sind 5 Immunglobulinklassen bekannt: IgG, IgA, IgM, IgE und IgD. Diese Moleküle haben folgende Strukturmerkmale gemeinsam: Sie sind symmetrisch aufgebaut, bestehen aus zwei gleichlangen, schweren Ketten (H-Ketten) und zwei etwa halb so großen leichten Ketten (L-Ketten). Die L-Ketten flankieren die H-Ketten vom Aminoende her und sind mit diesen durch Disulfid-Brücken verknüpft. Hierdurch werden die Fab-Anteile der Antikörpermoleküle formiert. Die noch freien Anteile der schweren Ketten bilden den Fc-Teil.

Der strukturelle Grundbaustein, aus dem sowohl H-wie auch L-Ketten gebildet sind, ist eine räumlich gefaltete Polypeptidkette aus 110 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 12 KD. Die L-Ketten sind bei allen Immunglobulinen aus 2 Domänen aufgebaut, die H-Ketten beim IgG aus 4 und beim IgM aus 5 Domänen. Die Domänen sind untereinander durch die fortlaufende Polypeptidkette verbunden.

In der vom Aminosäureende aus betrachteten ersten Domäne gibt es variable Bezirke, während die anderen Domänen für alle Immunglobuline einer Klasse konstant sind. In den variablen Bezirken gibt es wiederum 3 -4 hypervariable Zonen, die für die Antigenspezifizität verantwortlich gemacht werden.

Für die Interaktion von Antigen und Antikörper ist auch das sogenannte Gelenkstück (hinge region) von großer Bedeutung, da es eine ausreichende Beweglichkeit des Fab-Armes erlaubt.

Neben den besprochenen Gemeinsamkeiten gibt es auch einige erhebliche Differenzen. Im Hinblick auf die in dieser Untersuchung analysierten Immunglobulinklassen werden im Folgenden nur IgG, IgM und IgE behandelt:

Den größten Anteil der Immunglobuline nimmt das IgG mit ca. 80% der Proteinmenge ein. Es vereinigt nahezu alle Eigenschaften eines Antikörpers auf sich. Mit seinem Fc-Teil kann es über die CH 2 Domäne mit dem Komplementsystem reagieren. Hierbei wird diese Zone an die erste Komplementkomponente gebunden. In geringem Maße wird es über die Niere ausgeschieden. Der Haupteil wird im RES (Leber) und im Darm abgebaut. Die Halbwertszeit beträgt 21 Tage, 45% der Gesamtmenge zirkulieren im Blut. Neben einer Beteiligung an Opsonierungsvörgängen und der Phagozytose kann es in einem Feedback Mechanismus auf die eigene Synthese einwirken. Durch die Bindung von spezifischen Antigenen entstehen Immunkomplexe, die über den Fc-Rezeptor an Makrophagen angelagert werden können, wodurch das Antigen den Makrophagen

wesentlich näher gebracht wird. Über die bisher geschilderten Aufgaben hinaus kann IgG an allergischen Reaktionen vom Arthus Typ beteiligt sein. In diesem Zusammenhang spielt eine Betrachtung der 4 Subklassen eine Rolle. So kann IgG4 praktisch nicht zu einer Komplementaktivierung führen. Eine Bindung an Makrophagen ist nur durch IgG1 und 3 möglich.

Im Gegensatz zum IgG bildet das IgM im wesentlichen Pentamere. Die 7 S Einheiten werden dabei von Peptiden mit einem Molekulargewicht von 25 KD zusammengehalten. IgM hat von allen Immunglobulinen die höchste elektrophoretische Beweglichkeit. Bei Immunreaktionen des Körpers tritt dieses Immunglobulin zuerst auf. Es hat eine Halbwertszeit von 10 Tagen. Der größte Anteil befindet sich intravasal und steht hier der Akutabwehr zur Verfügung. Im Gegensatz zum IgG ist schon ein IgM Molekül in der Lage das Komplementsystem zu aktivieren.

IgE liegt vom Molekulargewicht her zwischen IgG und IgM. Im Gegensatz zum IgG gibt es keine verschiedenen Subklassen. IgE liegt nur zum Teil in freier Form im Serum vor. Der andere Teil ist über Zellrezeptoren u.a. an Mastzellen gebunden. In dieser Bindung kann IgE über Wochen persistieren. Im Gegensatz zu IgG und IgM ist es nicht in der Lage Komplement zu binden. Eine gewisse Aktivierung des alternativen Komplementweges soll möglich sein. Die Hauptfunktion liegt allerdings in der Vermittlung allergischer Reaktionen vom Typ I.

## 6. 2. Komplementsystem:

Der Begriff Komplement wird einem System von im Serum vorhandenen Faktoren zugeordnet, die einem charakteristischen Aktivierungsmodus unterliegen und eine Vielzahl biologisch wesentlicher Vorgänge vermitteln:

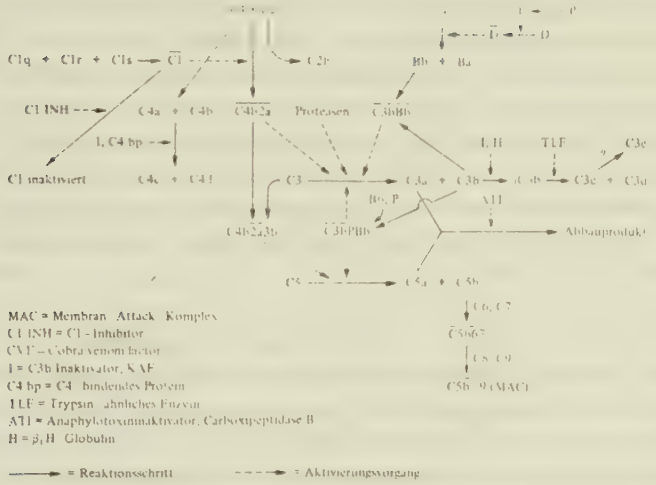
1. unspezifische Abwehr von Bakterien
2. Elimination von Immunkomplexen
3. Vermittlung anaphylaktischer Reaktionen

In den meisten Fällen spielen sich diese Vorgänge an Zellmembranen ab und führen zur Lyse bestimmter Zielzellen.

Die Synthese der einzelnen Komplementkomponenten erfolgt in z.T. sehr unterschiedlichen Geweben, wie z.B. Makrophagen, Fibroblasten, intestinalen Epithelzellen, Leberzellen und peripheren mononukleären Zellen (Porter et al., 1979).

Viele Faktoren finden sich als inaktive Vorstufen im Serum. Durch die Aktivierung erhalten sie enzymatische Aktivität zur Proteolyse und damit zur Aktivierung der nächsten Komponente, so daß eine kaskadenartige Reaktionsabfolge wie im Gerinnungssystem zustande kommt. Eine begrenzte und kompensierte Aktivierung des Systems liegt zu allen Zeiten vor. Diese wird durch sogenannte Regulatorproteine kontrolliert:

Abb. 1 : Das Komplementsystem (vereinfachte Darstellung)
(aus: V. [illegible] Der Beitrag des Komplementsystems, Monatsschr. Kinderh. 134 (1986) 1: 70[illegible])



Eine Aktivierung des klassischen Komplementweges kann durch Immunkomplexe, trypsinähnliche Proteine, Plasmin, Hagemann-Faktor, CRP, DNA und andere Substanzen in Gang gesetzt werden (Cooper et al., 1978). Darüberhinaus wurde ebenfalls eine Aktivierung durch die autokatalytische Umformung von C1 beobachtet (Ziccardi et al., 1972). Bei einer Aktivierung kommt es zuerst zu einer Anlagerung von Aktivatoren an C1q. In den Immunkomplexen erfolgt diese Bindung über den Fc Teil der Immunglobuline und zwar für das IgG mit der CH 2 Domäne und für das IgM über die CH 3 Domäne (Ellerson et al., 1972). Allerdings unterscheiden sich die einzelne IgG Subklassen hinsichtlich ihrer Fähigkeit das Komplementsystem zu aktivieren. So besitzt IgG3 die beste Bindungsfähigkeit, während IgG4 praktisch gar nicht bindet. Nach Anlagerung der Aktivatoren an C1q kommt es durch molekulare Umformung in Anwesenheit von Ca zur Freilegung enzymatisch aktiver Teile von C1r, wodurch nun C1s in die aktive Form überführt wird (Ziccardi et al., 1978). Dieser so gebildete aktivierte C1-Komplex kann nun C2 und C4 spalten, wodurch die molekularen Bindungsstellen in diesen Molekülen aktiviert werden. Es kommt zur Zusammenlagerung der jeweils größeren Fragmente C2a und C4b. Der enzymatisch aktive Teil der entstandenen C3-Konvertase, C4b2a, ist das C2a, während das C4b für die Bindung an Membranen zuständig ist (Müller-Eberhard, 1976).

Nachdem durch die C3-Konvertase C3 in C3a und C3b gespalten worden ist, wird das C3b in den C4b2a Komplex integriert, wodurch dieser die Fähigkeit erlangt C5 in C5a und b zu spalten. Das C3b ist in diesem Komplex für die Substratspezifizität verantwortlich. Durch die Spaltung von C5 wird die Effektoreinheit des Systems aktiviert, wodurch es in einem molekularen Assoziationsprozeß zur Bildung des Membran-Attack-Komplexes C5b-C9 kommt.

Der molekulare Aktivierungsprozeß für den alternativen Weg ist noch unklar (Wahn, 1983). Die Aktivierung kann durch IgA-Aggregate, Schlangengift, Zymosan, Inulin, Kaninchenerythrozyten Endotoxin u.v.m. erfolgen (Atkinson et al., 1980).

In der Vergangenheit wurde der C3-Nephritis-Faktor, der bei der Membranoproliferativen Glomerulonephritis gefunden wird, als Initialfaktor angeschuldigt. In der letzten Zeit wird diese Ansicht abgelehnt (Daha et al., 1976). Sicherlich führt aber die Aktivierung dieses Weges über die Faktoren D, B und Properdin, wobei letzterem wahrscheinlich nur eine stabilisierende Funktion zukommt (Medicus et al., 1976). Durch die Anlagerung von aktiviertem Faktor B an C3b entsteht eine weitere C3-Konvertase, die sich als Verstärkungsschleife auswirkt. Durch die Reaktion mit Faktor H wird das aktivierte B-Fragment abgespalten und das freiwerdende C3b durch C3b INA (Faktor I) in C3bi und letztlich in C3c und C3d überführt. Der Faktor I ist wahrscheinlich mit dem C4 INA identisch. Weitere Regulatorproteine sind der C1 INA, der z.B. beim sogenannten Quincke Ödem fehlt und der C3a INA, durch den C3a und C5a abgebaut werden. Diese beiden Spaltprodukte spielen eine erhebliche Rolle bei der Antigenelimination durch Chemotaxis und bei der Vermittlung allergischer Reaktionen. C3a und C5a haben kininähnliche Aktivität, wodurch es bei der Entstehung dieser Spaltprodukte zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität kommt. Darüberhinaus ist eine Anlagerung an Mastzellen möglich, durch die es zu einer Freisetzung von Histamin kommt, das dann seinerseits zu den typischen Symptomen der allergischen Sofortreaktion führen kann.

Neben der Vermittlung allergischer Reaktionen ist das Komplementsystem über den C3b/4b Rezeptor an der Vermittlung von Opsonisation und Phagozytose beteiligt (Ehlenberg et al., 1976 und Dierich et al., 1977). Durch diese Verstärkerreaktionen wird die Elimination von Immunkomplexen und damit von Antigenen beschleunigt.

## 6. 3. Immunkomplexe:

Immunkomplexe (IC) werden aus Antigen und Antikörper aufgebaut. Die Struktur der IC hängt im wesentlichen von der Antigen-Antikörper-Relation ab. Bei deutlichem Antigenüberschuß kommt es zur Bildung kleiner Immunkomplexe, die praktisch nur ein Antikörpermolekül

enthalten. Hierdurch verweilen diese IC sehr lange in der Zirkulation, ohne eliminiert zu werden. Allerdings sind diese Komplexe in der Regel nicht in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren. Die einmal gebildete Struktur unterliegt einem Fließgleichgewicht und ändert sich entsprechend der Zufuhr oder Neubildung von Antikörpern. Es kommt zur Bildung größerer Komplexe, die dann leichter phagozytiert werden können und auch das Komplementsystem aktivieren. Letzteres ist in der Nähe des Äquivalenzpunktes in leichtem Antigenüberschuß am besten möglich. Sehr große Komplexe werden bei Antikörperüberschuß gebildet. Sie bleiben bei der ersten Passage in den Maschen des RES hängen und werden auf diese Art und Weise sehr schnell eliminiert.

Weitere Einflüsse auf die Struktur haben der Aufbau des Antigens und dessen Antikörperbindungsstellen. So führen polyvalente Antigene eher zur Vernetzung als uni-oder bivalente.

Die Funktion der IC liegt besonders in der beschleunigten Elimination von Antigenen. Durch die Bindung eines Antigens an einen Antikörper kann es zu einer Komplementaktivierung kommen, die zur Bildung von C4b und C3b führt. Über diese beiden Spaltprodukte kann die Phagozytose der IC vermittelt werden. Als Begleitreaktion kann es durch die Freisetzung vasoaktiver Amine zu allergischen Reaktionen kommen. Hierdurch wird die Abwanderung der IC durch weitgestellte Kapillarendothelien gefördert. Dieser Umstand wirkt sich wiederum positiv auf die Phagozytosemöglichkeit der Komplexe aus. Außerdem kann hierdurch ein engerer Kontakt zwischen B-Zelle und Antigen hergestellt werden. Um eine überschießende Immunantwort zu vermeiden, kann der Fc Teil des Immunglobulins an T-Suppressorzellen binden, wodurch die Antikörpersynthese unterdrückt wird (Moretta et al., 1978).

## 7. Fragestellung:

Wie schon oben ausführlich dargelegt, ist l-Asp ein wesentlicher Bestandteil in der Behandlung kindlicher Leukämien, der aber durch seine Proteineigenschaften zur Bildung spezifischer Antikörper und dadurch zu allergischen Reaktionen führen kann Im wesetlichen wurden IgG Antikörper für die beobachteten Effekte verantwortlich gemacht. Deshalb sollten in einem möglichst großen Patientenkollektiv die Bildung spezifischer IgG Antikörper untersucht und mit derjenigen von IgM und IgE Antikörpern hinsichtlich Häufigkeit und Bedeutung für allergische Reaktionen verglichen werden.

Bei Patienten, die spezifische Antikörper gebildet haben, ist die Entstehung von spezifischen Immunkomplexen denkbar, wodurch die gesehene Aktivierung des klassischen Komplementweges erklärt werden könnte. Außerdem wäre eine Beeinflussung der Eliminationsgeschwindigkeit des Medikamentes möglich. Es sollte daher ein Test zur Messung spezifischer Immunkomplexe aufgebaut werden. Die Ergebniss dieser Untersuchungen sollten mit denen aus den Antikörpertesten korreliert werden. Die Bedeutung von spezifischen Antikörpern und Immunkomplexen für das Auftreten allergischer Reaktionen und für Veränderungen in der Eliminationsgeschwindigkeit der l-Asp sollten evaluiert werden.

Durch die Untersuchung vier verschiedenener l-Asp-Präparationen hinsichtlich Proteinzusammensetzung und Kreuzreaktivität mit spezifischen Antikörpern sollte Hinweise liefern, ob durch die Verwendung anderer Präparationen allergische Reaktionen bei den Patienten verhindert werden können.

In der Vergangenheit wurde auch ein Zusammenhang zwischen der Bildung spezifischer Antikörper und den Remissionszeiten der Patienten beobachtet. Dieser Sachverhalt sollte in dieser Untersuchung ebenfalls berücksichtigt werden.

## II. Patientengut und Methodik

### 1. Patientengut und Probengewinnung

#### 1.1. Patientengut

Im Zeitraum von November 1981 bis Mai 1984 wurden die Seren von 22 Kindern im Alter von 3 bis 15 Jahren, die an akuter lymphoblastischer Leukämie erkrankt waren und in der Onkologischen Abteilung der Universitätskinderklinik Düsseldorf behandelt wurden, untersucht (Tab. 1.). 9 der Kinder waren weiblichen, 13 männlichen Geschlechtes. Bei 15 Patienten wurden neben der Messung kurz vor und nach den l-Asp-Infusionen auch zu den Zeitpunkten 2, 4, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach l-Asp-Gabe Blutproben entnommen.

Die Patienten wurden nach dem Protokoll der Kooperativen Leukämie Studie 1982 (K. Winkler et al., 1983) behandelt. Diese Behandlung beinhaltet die Kombination unterschiedlicher Zytostatika wie Vincristin, Adriamycin, Methotrexat, Asparaginase, Methylprednisolon Darüberhinaus wird eine ZNS-Bestrahlung durchgeführt. Randomisiert werden Immunglobuline verabreicht zur Stützung der körpereigenen Abwehr. Im Protokoll werden high risk von low risk Patienten durch den Typ der ALL und die Zahl der Leukozyten vor Therapiebeginn bei der c-ALL unterschieden. Definitionsgemäß gehören zum low risk Typ alle Patienten, die älter als 2 und jünger als 7 Jahre sind, eine initiale Blastenzahl von weniger als 25000/$mm^3$ haben und deren Erkrankung immunologisch als common-ALL-Antigen positiv typisiert worden ist (Winkler et al., 1983). Die Aggressivität der Therapie ist bei den low risk Patienten ausschließlich während der letzten Phase der Induktions - bzw. Reinduktionsbehandlung vermindert worden, so daß die Behandlung mit l-Asp zumindest in der Induktionsphase vollkommen identisch ist.

Tab. 1 : Klinische Daten der untersuchten Patienten, Seite 1

| Patient | Alter | Geschl | Diagnose; Risiko-gruppe | Therapieschema | Beobachtungszeitraum | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A., J. | 6 J. | weibl. | NHL, high risk | Pilot CoALL 82 | Inf. 1 Reind. | Allergische Reaktion (Übelkeit, Juckreiz, Flush, Brechreiz) |
| B., S. | 5 J. | männl. | c-ALL, low risk | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 3, 4 Ind. | |
| B., S.+ | 13 J. | weibl. | ALL, 1. Rezidiv | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 3, 4 Ind. | Allerische Reaktion 4. Ind. (Schweißausbruch, Kollaps) |
| B., D.+ | 6 J. | weibl. | ALL, high risk | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 3, 4 Ind. | |
| B., T. | 5 J. | weibl. | c-ALL, low risk | Pilot CoALL 82 | Inf. 1. Rind. | Allergische Reaktion (Kollaps, Flush) |
| B., M.+ | 11 J. | männl. | c-ALL, low risk | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 3, 4 Ind | |
| D., V.+ | 4 J. | weibl. | ALL, low risk | Pilot CoAll 82 | Inf. 1, 2, 3, 4 Ind. | |
| D., D.+ | 3 J. | männl. | ALL, high risk | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 3, 4 Ind. | |
| G., G | 5 J. | männl. | ALL, high risk | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 3, 4 Ind. | Allergische Reaktion 4. Ind (Flush, Erbrechen, Juckreiz |
| G., Ch | 4 J. | männl. | ALL, low risk | | Inf. 1, 2, 3, 4 Ind. | |
| K., Th.+ | 9 J. | männl. | ALL, high risk | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 4 Ind. | |
| K., A. + | 3 J. | männl. | c-ALL, high risk | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 3 Ind. | |

Tab. 1 : Seite 2

| Patient | Alter | Geschl. | Diagnose, Risiko-gruppe | Therapieschema | Beobachtungszeitraum | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| K., H.+ | 4 J. | weibl. | c-All, high risk | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 3, 4 Ind. | |
| K., R. | 15 J. | männl. | c/t-ALL, high risk | Pilot CoALL 82 | Inf. 4 Ind. | Allergische Reaktion 4. Ind (Flush, Erbrechen |
| N., M.+ | 6 J. | männl. | ALL, high risk | Pilot CoALL 82 | Inf. 4 Ind., Inf. 1, 2, 3, 4 Reind. | Allergische Reaktion 4. Ind (Flush, Erbrechen |
| R., M.+ | 5 J. | männl. | ALL, high risk | CoALL 82 | Inf. 1, 3, 4 Ind. | |
| S., A.+ | 15 J. | männl. | NHL/c-ALL, high risk | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 3, 4 Ind. | Allergische Reaktion bei Ind (Erbrechen, Kollaps) |
| S., J.+ | 8 J. | weibl. | ALL, high risk | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 3, 4 Ind. | |
| S., B.+ | 4 J. | weibl. | c-ALL, low risk | CoALL 82 | Inf. 1, 2 Ind. | |
| ST., G.+ | 9 J. | männl. | c-ALL, high risk | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 3, 4 Ind. | |
| Th., M.+ | 3 J. | männl. | ALL | CoALL 82 | Inf. 1, 2, 3 Ind. | |
| Z., A. | 4 J. | weibl. | c-ALL, high risk | Pilot CoALL 82 | Inf. 1 Reind. | Allergische Reaktion (Flush, Bauchschmerzen, Erbrechen) |

Bei den mit + gekennzeichneten Patienten wurden die Kontrollen auch nach 2, 4, 12, 24, 36 und 48 Stunden durchgeführt

Kol

Inf = Infusion; Ind = Induktionsphase; Reind = Reinduktionsphase

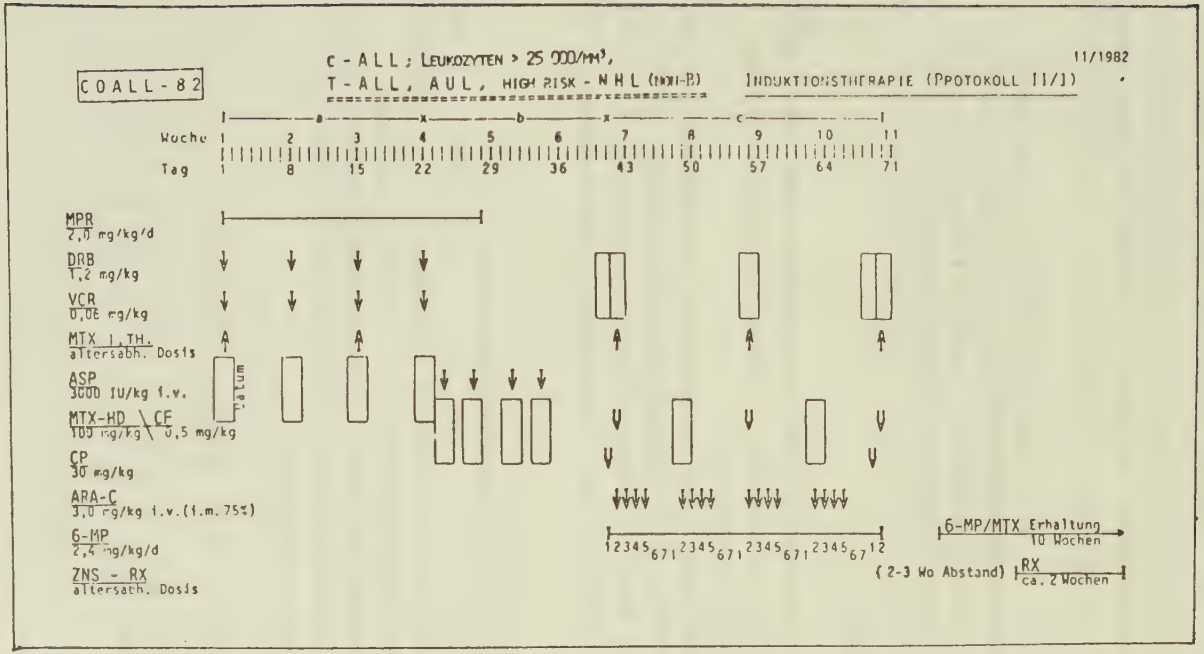



Abb.2 Induktionsschema des CoALL 82 Protokolles für die Patienten der high risk Gruppe
Die l-Asparaginase wird nach diesem Schema in der 4 bis 6 Therapiewoche verabreicht.

l-Asp wird in einem Block aus 4 mal 3000 E/kg KG im Abstand von 3 Tagen intravenös verabreicht. Sie stellt zu diesem Zeitpunkt neben der Gabe von Prednison die einzige medikämentöse Behandlung dar (Abb.

Einige der Patienten, die nach dem Pilot CoALL 82 Schema behandelt wurden erhielten, einen gleichartigen Block auch in der Reinduktionsphase, in der endgültigen CoALL 82 Studie wird diese Therapie nur noch in der Induktionsphase durchgeführt.

1. 2. Probengewinnung

Das Blut wurde zur Gewinnung von Serum und EDTA-Plasma wurde über eine liegende Braunüle aus einer peripheren Vene entnommen. Zur Serumgewinnung wurde das Blut ca.
30 Minuten bei Zimmertemperatur belassen und anschließend bei 700 g für 15 min. zentrifugiert. Das EDTA-Blut zur Gewinnung von Plasma wurde sofort nach der Entnahme zentrifugiert. Bis zur Bearbeitung wurden die Serum-und Plasmaproben in Aliquots bei - 70°C eingefroren.

2. Erstellung der Kontrollen und der Statistiken

Für die verschiedenen Tests wurden die Blutproben von 50 gesunden, erwachsenen Spendern untersucht und als Kontrollen verwendet. Statistische Berechnung erfolgten je nach Fragestellung mit dem Wilcoxon Test für verbundene bzw. mit dem Whitney-Mann-Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben.

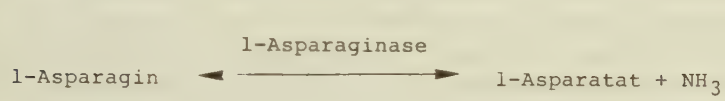
3. Enzymatische Messung der l-Asparaginase-Aktivität

Der Test wird modifiziert durchgeführt nach einem in Bergmeyer (1974) beschriebenem Prinzip.
Reagentien:

0,2 m Tris-HCL-Puffer pH 8,6
l-Asparagin (Sigma, München) 3 mg/ml Aqua dest.

3 M Trichloressigsäure
Neßler Reagenz (Merck, Darmstadt); Lösung A und B werden im Verhältnis 1:1 gemischt.

Testprinzip




Die l-Asp-Aktivität wird anhand des bei der Reaktion freiwerdenden NH gemessen, das mit dem Neßler Reagenz einen gelben Farbkomplex bildet.

Durchführung:

| | Leerwert | Probe |
|---|---|---|
| Tris-Puffer | 1,0 ml | 1,0 ml |
| l-Asparaginlösung | 1,0 ml | 1,0 ml |
| Probe | | 10 µl |

30 Minuten bei 37°C inkubieren

| | | |
|---|---|---|
| Trichloressigsäure | 0,1 ml | 0,1 ml |
| Serumprobe | 10 µl | |

wiederum zugeben und mischen. Zur Abtrennung der gefällten Eiweiße wird das Ganze bei 4°C und 2000 g 10 Minuten lang zentrifugiert

Nach der Zentrifugation werden jeweils 250 µl der Überstände in 4,25 ml Aqua dest verdünnt. Hierzu gibt man 500µl verdünnte Neßler Lösung. Nach dem Mischen beläßt man das Reaktionsgemisch für 1 Minute bei Zimmertemperatur und mißt die entstandene Farbentwicklung anschließend bei 436 nm. Die Auswertung erfolgt anhand einer Standardkurve. Zum Ausschluß etwaiger Einflüsse der äußeren Versuchsbedingungen wurde bei jeder Testserie ein Standard - z.B. 10E/ml - mitgeführt.

Kontrolle der Testbedingungen

a) Verschiedene Konzentrationen an Ammoniumsulfat wurden im basischen Medium (d.h. dem Tris Puffer) gemischt. Dabei dissoziert das Ammoniumsulfat in ein Sulfatanion, 2 $H_2O$ Moleküle und 2 Ammoniakmoleküle, die mit dem Neßlerschen Reagenz reagieren. Es entstehen also pro Mol Ammoniumsulfat im basischen Medium 2 Mole Ammoniak. Nach folgender Formel lassen sich hieraus diejenigen Enzymeinheiten im Testansatz berechnen, die zu einer bestimmten Extinktion durch den Umsatz einer bestimmten Menge Ammoniak mit Neßler Reagenz führen:

$$\text{Enzymeinheiten/ml} = \frac{\mu\text{mol Substratumsatz/ml}}{\text{Minute}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Verdünnungsfaktor beträgt beim Einsatz von 10µl l-Asp-Lösung im Testansatz 100, da die Enzymeinheiten pro ml berechnet werden. Die Reaktionsdauer beträgt 30 Minuten.

b) Die Asparaginkonzentration im Testansatz wurde mit 3 mg/ml so gewählt, daß auch bei den höchsten zu erwartenden l-Asp-Serumspiegeln ein Substrat überschuß besteht. Es muß jedoch darauf hingewisen werden, das die Methode im Bereich hoher l-Asp-Aktivitäten (größer 60E/ml) an Zuverlässigkeit verliert, so daß eine Verdünnung solcher Proben sinnvoll erscheint.

c) Weiterhin mußte geklärt werden, ob die im Test gemessenen Extinktionen durch das Medium, in dem die l-Asp verdünnt wird (also z.B. Aqua dest oder Serum) beeinflußt wird. Hierzu wurde der Testansatz mit den entsprechenden Verdünnungsmedien durchgeführt. Der Einfluß verschiedener Ammoniakkonzentrationen in den Seren der Patienten wurde durch die Messung der Probenleerwerte weitgehend ausgeschlossen.

e) Schließlich mußten die vom Hersteller angegebenen Enzymeinheiten pro ml Lösung mit dem Test überprüft werden. Hierzu wurden die Extinktionen aus Ansätzen mit verschiedenen l-Asp-Aktivitäten mit denen, die unter a) beschrieben wurden, verglichen.

Erstellung der Standardkurve

Die Standardkurve zur Auswertung des Testes wurde durch die Messung einer hinreichend großen Anzahl von verschiedenen l-Asp-Aktivitäten im Doppelansatz ermittelt. Die gemessenen Extinktionen wurden gegen die eingesetzten Enzymeinheiten pro ml aufgetragen (Abb. 3).

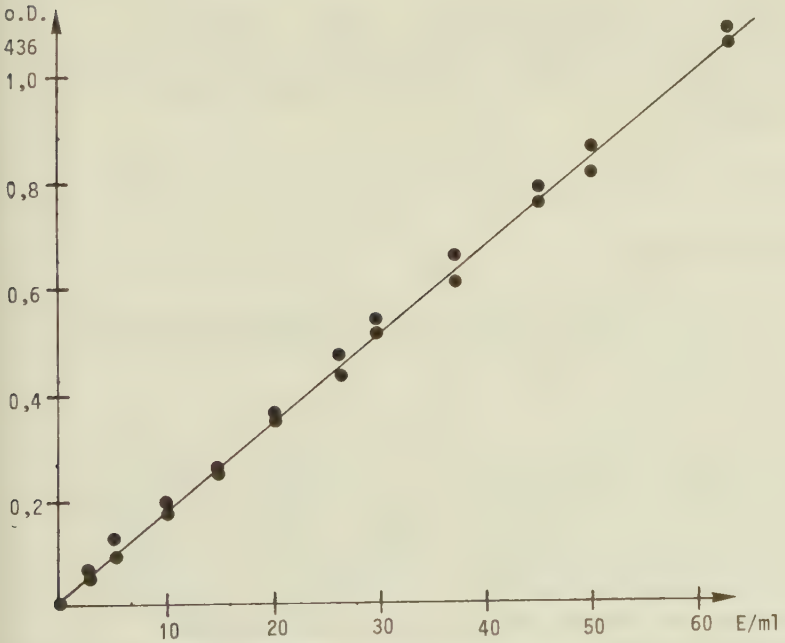



Abb. 3 Standardkurve für die l-Asparaginase-Aktivität-Messung im Serum. Die Extinktionen (Ordinate) von 12 verschiedenen l-Asparaginase-Aktivitäten (Abszisse) wurden im Testansatz ermittelt.

4. Messung des l-Asparaginase-Antigens:

Reagentien:

Glycin-Kochsalz-Puffer

15 g Glycin
17 g NaCl
5ml 1 N NaOH und
1,5 g Di-Na-EDTA
werden gemischt. Das Ganze wird mit Aqua dest. auf 1500 ml aufgefüllt. Der pH Wert wird mit 10% Soda-Lösung auf 8,2 eingestellt. Das Volumen wird zu 2 Liter mit Aqua dest. ergänzt.

Agar: 1,5 g Agar purum (Behring, Marburg) werden in 100 ml Glycin-Kochsalz-Puffer durch Kochen gelöst ,bis die Lösung klar wird. Vor der Antikörperzugabe wird das Gel auf 56°C abgekühlt.

Anti-l-Asp-IgG vom Kaninchen (Herstellung siehe 6.)

Prinzip und Durchführung:

Die Messung des l-Asparaginase-Antigens wurde durchgeführt nach dem Prinzip der radialen Immundiffusion, wie es von Mancini et al. (1965) beschrieben wurde.

3,5 ml des 1,5% Agars werden zuerst bei 100°C gelöst, dann auf 56°C abgekühlt und mit 10µl Antikörper gut vermischt. Die Mischung wird auf eine 5x5 cm große Glasplatte gegeben. Mit einer Stanze (Durchmesser 3 mm, LKB) werden Löcher in den Agar gestanzt und mit einer Wasserstrahlpumpe ausgehoben. In jede Vertiefung werden 5µl Serum gegeben. Die Platten werden dann 3 Tage lang bei Zimmertemperatur zur Diffusion in einer feuchten Kammer belassen. Nach dieser Zeit wird das Gel 1 Stunde in physiologischer Kochsalzlösung und anschließend dieselbe Zeit in Aqua dest gewaschen. Danach wird es getrocknet. Die Färbung erfolgt über 15 Minuten in

folgender Lösung: 5g Coomassie Blue (Brillant Blue R 250, Merck, Darmstadt) werden in 1 Liter Entfärber gelöst. Die Entfärbung bis zum Erhalt eines klaren Hintergrundes wird in folgender Lösung vorgenommen: 100ml Eisessig, 500 ml Methanol, 500 ml Aqua dest.

Auswertung

Auf jeder Platte werden Verdünnungen einer l-Asparaginase Stammlösung, deren enzymatische Aktivität mit dem oben beschriebenen Test vorher bestimmt wurde, als Standard mitgeführt. Die Durchmesser der so entstehenden Präzipitate werden gegen die l-Asp-Aktivität aufgetragen. Die Ergebnisse werden dementsprechend in E/ml ausgedrückt.

## 5. Proteinbestimmung nach Lowry

In mehreren der nachfolgend beschriebenen Methoden sind Bestimmungen des Proteingehaltes integriert. Diese Bestimmungen wurden nach der Vorschrift von Lowery et al. (1951) vorgenommen:

Material: BSA-Standard ( 1mg/ml)
Folin Reagenz (40g Na CO + 8g NaOH auf 2 l Aqua dest.)
Na-Tartrat 2%ig (2,37 g auf 100 ml Aqua dest.)
$CuSO_4$ 1%ig (1,56 g auf 100 ml Aqua dest.)
Phenol Reagenz nach Folin, 2 N

Vorgehen: Folgende Lösungen werden vor jeder Proteinbestimmung frisch angesetzt:
A) 100ml Folin Reagenz
1ml Na-Tartrat
1ml Cu-Sulfat

B) Phenol-Reagenz, 1+1 gemischt mit Aqua dest.

Ansatz: + Probe
+ 2ml Lösung A
+ 0,2ml Lösung B
30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
Messen der Extinktion bei 700 nm

Die Standardreihe sollte bis 0,2 mg linear verlaufen. Der Vergleich der Extinktionen von Proben mit den entsprechenden der Standardkurve ergibt die Proteinmenge, aus der sich die Proteinkonzentration der Probe berechnen läßt.

## 6. Präparation von Anti-l-Asp-F$(ab)_2$-Fragmenten

Die Präparation von Anti-l-Asp-F$(ab)_2$-Fragmenten läßt sich in drei Arbeitsschritte unterteilen:

1. Gewinnung der spezifischen IgG Antikörper
2. Herstellung der F(ab)2-Fragmente
3. Reinigung der Fragmente.

## 6.1. Gewinnung spezifischer Anti-l-Asp IgG-Antikörper vom Kaninchen

Zur Bildung der spezifischen Antikörper gegen l-Asp wurde das Kaninchen wöchentlich an vier verschiedenen Körperstellen mit insgesamt 5 mg Crasnitin-Trockensubstanz/Woche immunisiert. Bei der ersten Gabe wurde das Crasnitin 1:1 mit komplettem Freundschem Adjuvans (FA) beimpft, bei den weiteren Malen mit inkompletten FA. Die erste Gabe wurde intramuskulär appliziert, die folgenden 5 Boosterungen erfolgten durch subcutane Injektionen. Eine Woche nach der letzten Boosterung wurde das Tier durch Herzpunktion entblutet. Dabei konnten durchschnittlich ca. 60 ml Antiserum gewonnen werden. Die Spezifizität des Serums wurde durch Immunelektrophorese gegen l-Asp überprüft.

Im nächsten Schritt wurde aus dem Antiserum der spezifische IgG-Antikörper hergestellt. Die Vorschrift hierzu, sowie zur Herstellung der $F(ab)_2$-Fragmente entspricht der von Pereira und Theofilopoulos (Pereira et al., 1980).

Zur Herstellung der Antikörper werden 10 ml Antiserum eisgekühlt mit 5 ml ebenfalls eisgekühlter, gesättigter Ammoniumsulfatlösung tropfenweise versetzt. Gesättigte Ammoniumsulfatlösung ist ca. 5,35 M. Diese Mischung wird zur vollständigen Ausfällung der Globulinfraktion noch ca. 30 Minuten im Eisbad belassen. Anschließend werden die Nichtglobuline durch 15 minütige Zentrifugation bei 4°C und 2000g entfernt. Der Überstand wird dekantiert und das entstandene Präzipitat wird in 3 - 4 ml 0,07 m Phosphat-Puffer aufgenommen

0,07 M Phosphat-Puffer: 200 ml 0,07 M $Na_2HPO_4$ und 800 ml $NaH_2PO_4$ werden zusammengegeben. Hierbei ergibt sich ein pH-Wert von 6,3.

Die Lösung wird nun 16 h bei 4°C gegen diesen Puffer dialysiert. Das Dialysat wird am nächsten Morgen über eine Phosphat-Puffer-äquilibrierte DEA 52 - Säule (75 cm lang, Durchmesser 1,6 cm) aufgetragen und mit einer Geschwindigkeit von 60 ml/h in 1 ml Fraktionen eluiert. Zwischen 20 und 40 ml des Eluates befindet sich die IgG Fraktion (Abb. 4).

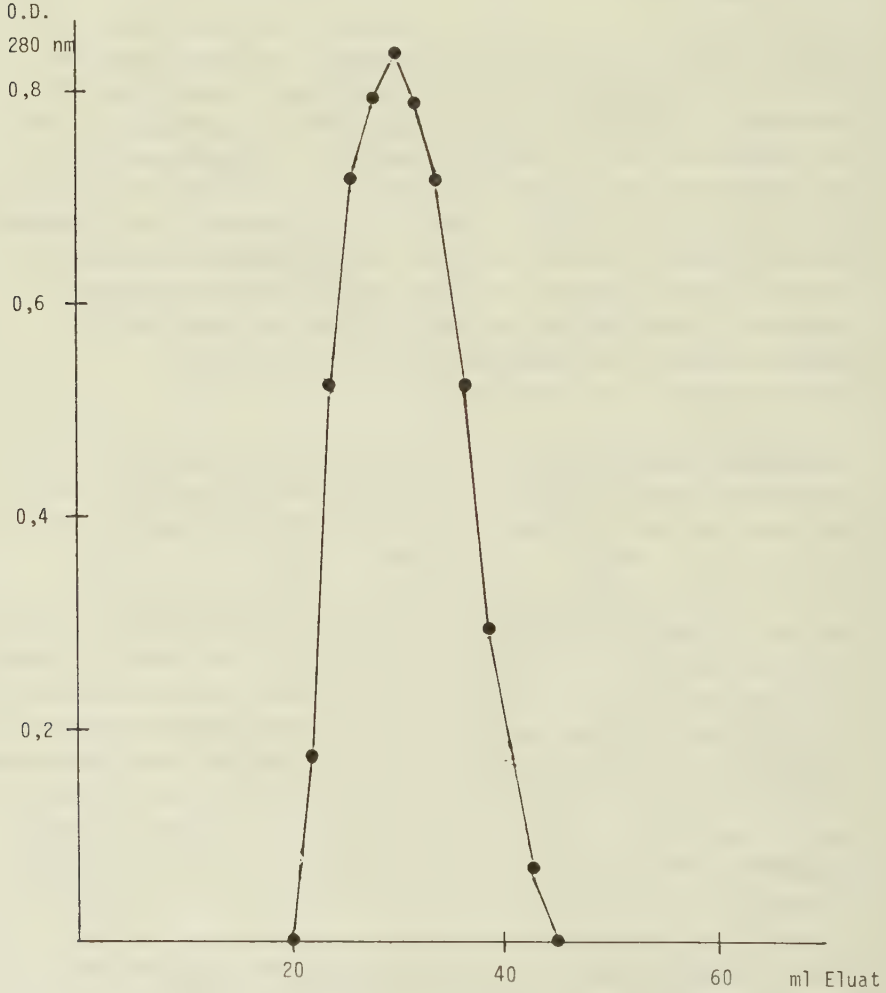



Abb. 4 Elutionsprofil der Globuline, die mittels Ammoniumsulfat gefällt worden waren, über eine DE 52 Säule. Im dargestellten Peak (zwischen 20 und 45 ml Eluat) befindet sich die IgG-Fraktion.

Die IgG haltigen Fraktionen werden durch Ouchterlony Diffusion gegen Anti-Kaninchen-IgG identifiziert und gepoolt (ca. 20-25 Fraktionen). Zur besseren Handhabung werden sie mittels Ultrafiltration (Amikon, Membran 10 YM 30, 25 mm Durchmesser) auf 10 ml Gesamtmenge eingeengt.

## 6.2. Herstellung der $F(ab)_2$-Fragmente

Die gepoolte und eingeengte IgG-Fraktion wird 16 Stunden bei 4°C gegen 0,2 m Acetatpuffer pH 4,0 dialysiert.

Acetatpuffer:

Base: 5,44 g Natrium-Acetat x 3 $H_2O$ in 200 ml $H_2O$
Säure: 8,39 ml Eisessig mit Aqua dest. ad 1 l

Säure und Base werden in einer Volumenrelation von etwa 600:180 gemischt, so daß ein pH Wert von 4,0 resultiert.

Nach der Dialyse werden pH Wert und Proteinkonzentration des Dialysates ermittelt. Hierauf wird das Dialysat mit Pepsin (kristallisiert, Boehringer, Mannheim) verdaut ( 3 mg Pepsin zu 100 mg IgG), in dem diese Mischung 16 Stunden bei 37°C inkubiert wird. Der hierbei entstehende Niederschlag wird durch Zentrifugation (15 Minuten, 700g, 4°C) entfernt. Der Überstand wird über Nacht gegen PBS dialysiert. Die Proteinkonzentration liegt dann im Dialysat etwa zwischen 3 und 5 mg/ml. Zur weiteren Reinigung werden die F(ab) -Fragmente über eine Sephadex G200 Säule (80 cm lang, 1,6 cm Durchmesser) mit 10 ml/h in 1 ml Fraktionen eluiert (Abb. 5). Die F(ab)2-Fragmente befinden sich nach Johnstone et al.(1982) im ersten Peak.

## 6.3. Reinigung der Fab2-Fragmente

Bei den in vitro Experimenten mit Kaninchen Antikörpern mußten die $F(ab)_2$-Fragmente vom Testprinzip her vollständig von ver-

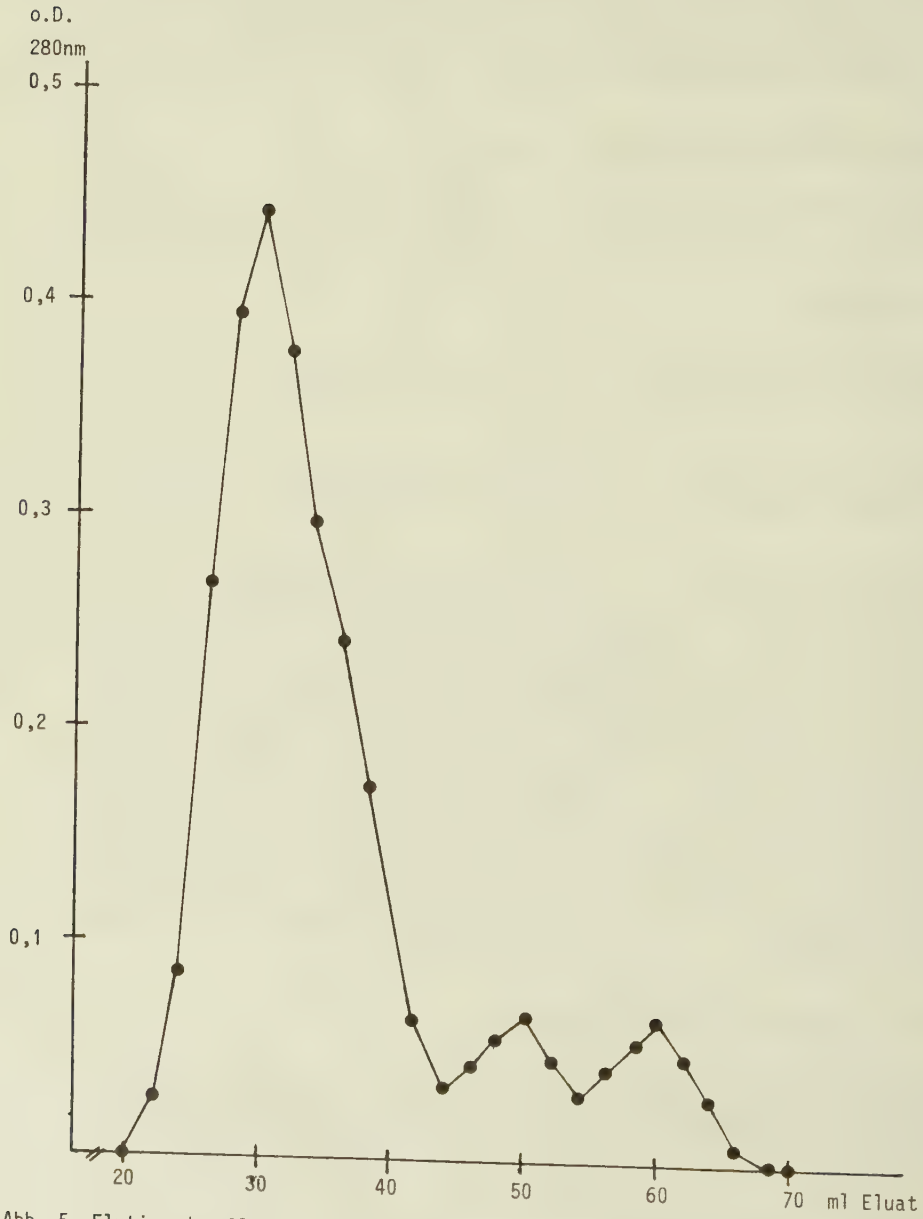



Abb. 5 Elution der Globulinfraktion, nachdem eine Pepsinspaltung durchgeführt wurde, über eine Sephadex G 200 Säule. Im ersten Peak befinden sich die F(ab)-Fragmente

unreinigenden Fc-Anteilen befreit werden, da das in Immunkomplexen gebundene Kanichen Anti-l-Asp IgG durch ein Fc-spezifisches Anti-Kaninchen-IgG erfaßt werden sollte.

Zu diesem Zweck wurde ein Anti-Kaninchen-IgG (Fc spezifisch) Antikörper (IgG-Fraktion, Cappel) an CN-Br-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) gebunden. Eine hiermit gepackte Säule wurde zur Absorbtion evtl. noch vorhandener Fc-Fragmente verwendet.

Reagentien:

Sepharose 4 B, CN-Br-aktiviert (Pharmacia, München)

Kopplungspuffer:

50 ml 0,1 M $NaHCO_3$ und 50 ml 0,1 M $Na_2CO_3$ werden gemischt, sodaß ein pH Wert von 8,3 resultiert. Hierzu werden noch 0,5 M NaClals Festsubstanz/l Lösung gegeben.

Fc-spezifisches Anti-Kaninchen IgG von der Ziege (Cappel)

Ligandenlösung: Bei der Mischung der Ligandenlösung mit der Gelsuspension soll, um eine optimale Ausnutzung der Bindungskapazität zu erreichen, eine Volumenrelation von 1:2 - entsprechend 5 bis 10 mg Protein in der Ligandenlösung zu 1 ml Gel - hergestellt werden. Dieses bedeutet, daß bei einem Gelvolumen von 3,5 ml x Gelmenge (in Gramm) das Volumen der Ligandenlösung 2 x 3,5 ml x Gelmenge betragen soll.

Für die Ligandenlösung wird also die entsprechende Menge des zu bindenden Proteins 2 Stunden gegen Kopplungspuffer dialysiert (5mg/ml).

Tris-HCl-Glycin:

0,2 ml Tris-Lösung (Tris-Hydroxymethyl-Ammoniummethan, Merck, Darmstadt; in Aqua dest) wird mit 1 N HCL auf einen pH Wert von

8,0 eingestellt. Hierzu werden Glycinin einer Menge von 0,2 Mol pro Liter Lösung gegeben.

Acetatpuffer

600 ml 0,2 M Essigsäure und 180 ml 0,2 M Na-Acetat werden gemischt, sodaß ein pH Wert von 4,0 resultiert. Dem Ganzen werden 0,5 M NaCl zugefügt.

PBS (siehe solid phase ELISA).

Thiocyanat-Lösung:

3 M KSCN werden in 0,5 M Ammoniak gelöst.

Durchführung:

Zuerst wurde die Sepharose 15 Minuten in einem Überschuß 1 mM HCl gequollen. 1 g Gel ergeben in der Suspension ca. 3,5 ml. Zur Äquilibration wurde das Gel anschließend über einen Büchnertrichter mit 200 m 1 mM HCl/g Gel gespült. In einem zweiten Waschvorgang wurde das Gel dann mit 5 ml Kopplungspuffer/g Gel gespült. Unmittelbar an diesen Schritt anschließend, wurde es in der oben beschriebenen Art und Weise mit der Ligandenlösung zusammengebracht und unter gelegentlichem Schütteln 2 Stunden bei Zimmertemperatur belassen. Nachdem sich das Gel im Reaktionskolben abgesetzt hatte, wurde im Überstand eine Proteinbestimmung durchgeführt, um die Effektivität des Kopplungsmanövers zu überprüfen. Hierbei fanden sich eine Proteinbindung am Gel von ca. 95%.

Um nun noch etwaige freie Valenzen im Gel abzusättigen, die während der Affinitätschromatographie zu unspezifischen Bindungen führen würden, wurde das Gel nach Entfernung des Kopplungspuffers für weitere zwei Stunden mit einem Überschuß an Tris-Gycin-Lösung inkubiert.

Zum Schluß wurde das präpariert Gel im Wechsel jeweils dreimal

mit Kopplungs- und Acetat-Puffer gewaschen. Mit diesem Gel wurde die Chromatographiesäule (15 cm lang, 1 cm Durchmesser) gepackt. Die Reinigung der $F(ab)_2$-Fragmente erfolgte nun entsprechend einer Beschreibung von Johnstone und (1982):

Hierzu wird die Säule zunächst mit 20 ml PBS, 10 ml Thiocyanatlösung und wieder 20 ml PBS gespült. Nun werden die $F(ab)_2$-Fragmente aufgetragen und mit 30 ml PBS eluiert. Hierbei läßt man die Säule soweit leerlaufen, bis kein Pufferreservoir mehr über dem Gel steht. Zur Elution der gebundenen Fc-Fragmente wird die Säule wie oben beschrieben behandelt, so daß sie nun erneut benutzt werden kann. Anschließend wurde die Säule mit PBS-NaN (0,02%) gespült und bei 4°C aufbewahrt.

Die gewonnenen hochreinen $F(ab)_2$-Fragmente werden mittels Ultrafiltration auf das Ausgangsvolumen eingeengt. (Die ersten 3 - 4 ml des Eluates können verworfen werden).

## 7. Solid Phase ELISA

Die im folgenden beschreibenen Methoden zur Messung spezifischer Antikörper (AK) gegen 1-Asp, 1-Asp-enthaltender Immunkomplexe und C3b-bindender Immunkomplexe (IC) folgen als solid phase ELISA Teste einem gemeinsamen Grundprinzip. Daher sei an dieser Stelle das Prinzip vergleichend dargestellt:

Ein Agens, das die im Serum vorhandenen Immunkomplexe bzw. Antikörper spezifisch bindet, wird an eine feste Phase (Mikrotiterplatte) immobilisiert. Für den Nachweis der Ak wird 1-Asp immobilisiert, für den der Immunkomplexe F(ab) -Fragmente gegen 1-Asp bzw. C3.

Die Menge des gebundenen Ak bzw. der IC wird dann bestimmt, in dem an diese ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti- Human-IgG Antikörper vom Schwein (Orion, Helsinki) abgelagert wird. Die Menge der gebundenen alkalischen Phosphatase, die sich zu dem im

Test immobilisierten Ak bzw. IC proportional verhält wird durch die Reaktion mit dem Substrat p-Nitrophenylphosphat ermittelt. Die entstehende Farbreaktion wird bei 405 nm gemessen. Eine schematische Darstellung der drei Methoden ist in den Abb. 6 gemacht worden.

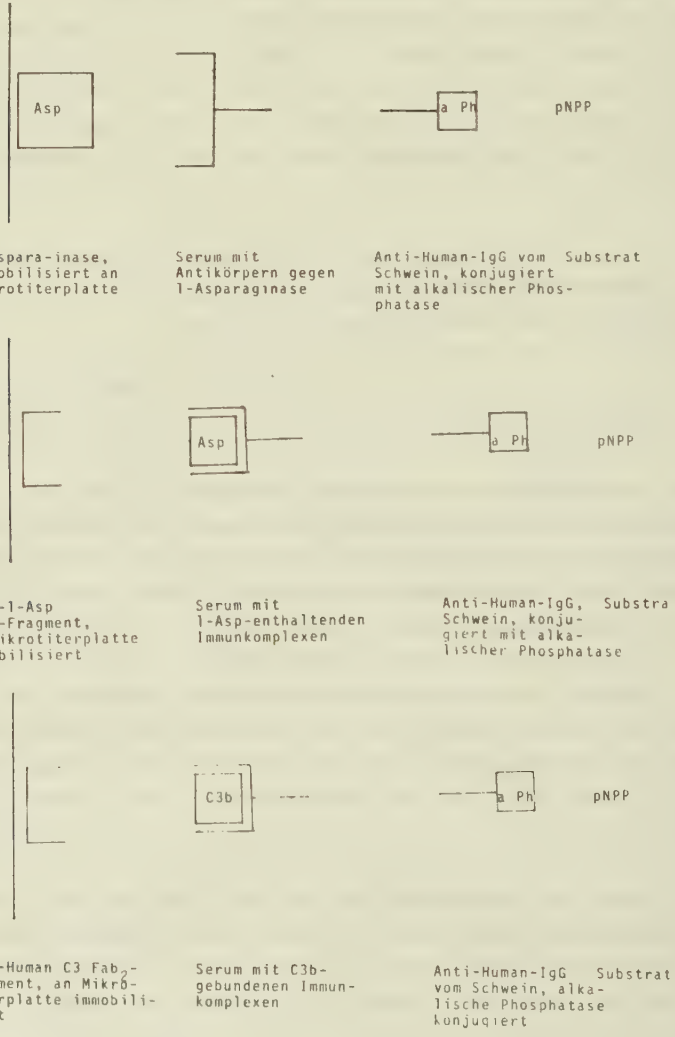


Abb. 6 Testprinzipien für die solid phase ELISA Teste. An eine feste Phase werden spezifische $F(ab)_2$-Fragmente bzw. l-Asparaginase gebunden. Im zweiten Schritt werden hieran aus den Seren die zu messenden Immunkomplexe bzw. Antikörper gebunden. Der Gehalt an immobilisierten IgG-Molekülen wird durch alklische Phosphatase konjugierte Antikörper erfaßt. Die gebundene Menge alkalischer Phosphatase wird durch die Reaktion mit para-Nitrophenolphosphat quantifiziert. Die entstehende Gelbfärbung wird bei 405 nm gemessen. Im oberen Anteil der Abbildung ist die Methodik für die Bestimmung von l-Asparaginase-spezifischen Antikörpern abgegeben, im mittleren Teil diejenige zur Messung l-Asparaginase-enthaltender Immunkomplexe und im unteren Abschnitt wird die Bestimmung C3b-bindender Immunkomplexe behandelt.

## 8. Bestimmung spezifischer Anti-l-Asp-IgG und IgM Antikörper in den Seren der Patienten mittles solid phase ELISA

### 8. 1. Reagentien:

Diäthanolaminpuffer: 97 ml Diäthanolamin (Merck, Darmstadt), 800ml Aqua dest., 0,2 g $NaN_3$, 0,1g $MgCl_2 \times 6\ H_2O$ werden gemischt und mit 1 N HCl auf pH 9,8 eingestellt. Anschließend wird das Ganze mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

Carbonat-Bicarbonat-Puffer: 1,59 g $Na_2CO_3$, 2,93 g $NaHCO_3$ und 0,2 g $NaN_3$ werden in einem Liter Aqua dest gelöst. Der pH Wert sollte 9,6 betragen.

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS): 7,6 g NaCl, 150 mg $KH_2PO_4$, 150 mg KCl, 1,15 g $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$ werden bis zu einem Gesamtvolumen von 1 l in Aqua dest. gelöst. Die Ionenstärke dieser Lösung entspricht der physiologischen.

PBS-Tween: 0,05% Tween 20 werden in PBS gelöst.

PBS-BSA-EDTA: Zu einem Volumenanteil 0,2 m EDTA-Lösung werden 19 Anteile PBS gegeben. Das Ganze wird mit 1% Rinderalbumin (Sigma, München) versetzt.

### 8. 2. Durchführung des Testes

Zuerst wird eine standardisierte Menge l-Asparaginase (Crasntin, 10 E/ml) in Carbonat-Bicarbonat-Puffer verdünnt durch 16 stündige Inkubation bei 4°C an eine Mikrotiterplatte (Dynatech, Denkendorf) gebunden. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte werden in diesem wie auch in den folgenden Arbeitsschritten 0,2 ml einpipettiert. Nach der Inkubationszeit wird die Platte jeweils dreimal mit PBS- Tween gewaschen.
Im zweiten Schritt werden die Proben (Patientenseren) in PBS-BSA-EDTA 1:20 verdünnt auf die Mikrotiterplatte gegeben und zur An-

lagerung an die 1-Asp 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wird nun ein Anti-Human-IgG bzw. IgM alkalische Phosphatase konjugierter Antikörper in standardisierter Verdünnung mit PBS-Tween auf die Mikrotiterplatte gegeben. Durch zweistündige Inkubation bei Zimmertemperatur wird dieser Antikörper gebunden. Nach drei weiteren Waschvorgängen wird nun das Substrat p-Nitrophenylphosphat (5mg/ml) in Diäthanolaminpuffer zugegeben. Nach 30 minütiger Reaktion bei Zimmertemperatur wird die entwickelte Farbreaktion mit einem automatischen ELISA-Meßgerät (Flow Laboratories, Bonn) bei 405 nm bestimmt.

## 8.3. Auswertung:

Da es sich erwiesen hat, daß die gemessenen Extinktionen nicht linear mit der vorhandenen Antikörpermenge steigen, wird für jede Mikrotiterplatte eine eigene Standardkurve erstellt. Hierbei dient als Standard ein Patientenserum mit hohem Ak-Gehalt, das mit gepooltem Normalserum serienmäßig verdünnt wird. Als Nullpunkt der Kurve dient die Messung des unspezifisch gebundenen IgG aus dem gepoolten Normalserum. Zur Bestimmung der IgM Konzentrationen der Patientenseren wird die Standardkurve um den Betrag versetzt, der sich aus der Differenz zwischen der unspezifischen Bindung von IgG und IgM ergibt, ähnlich wie es für C3b-bindende Immunkomplexe bei Körholz et al. (in Vorb.) beschrieben ist. Für die Standardkurve werden die gemessenen Extinktionen semilogarhythmisch gegen die Standardverdünnungen in % (100% = unverdünnt) aufgetragen. Demgemäß wird das Ergebnis für die Proben in % des Standards angegeben (Abb. 7).

## 8. 4. Standardisierung des alkalische Phosphatase konjugierten Antikörpers

Zu Beginn werden 100 ng/ml Cohn Fraktion II (Sigma, München) bzw. 200 ng/ml humanes Myelomprotein IgM (Cappel, Conranville, USA) in Carbonatpuffer verdünnt durch 16 stündige Inkubation bei 4°C an eine Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend werden nach dreimaligem Waschen verschiedene Verdünnungen des Konjugates in PBS Tween zugegeben. Der weitere Ablauf des Testes ist unter 7.2.

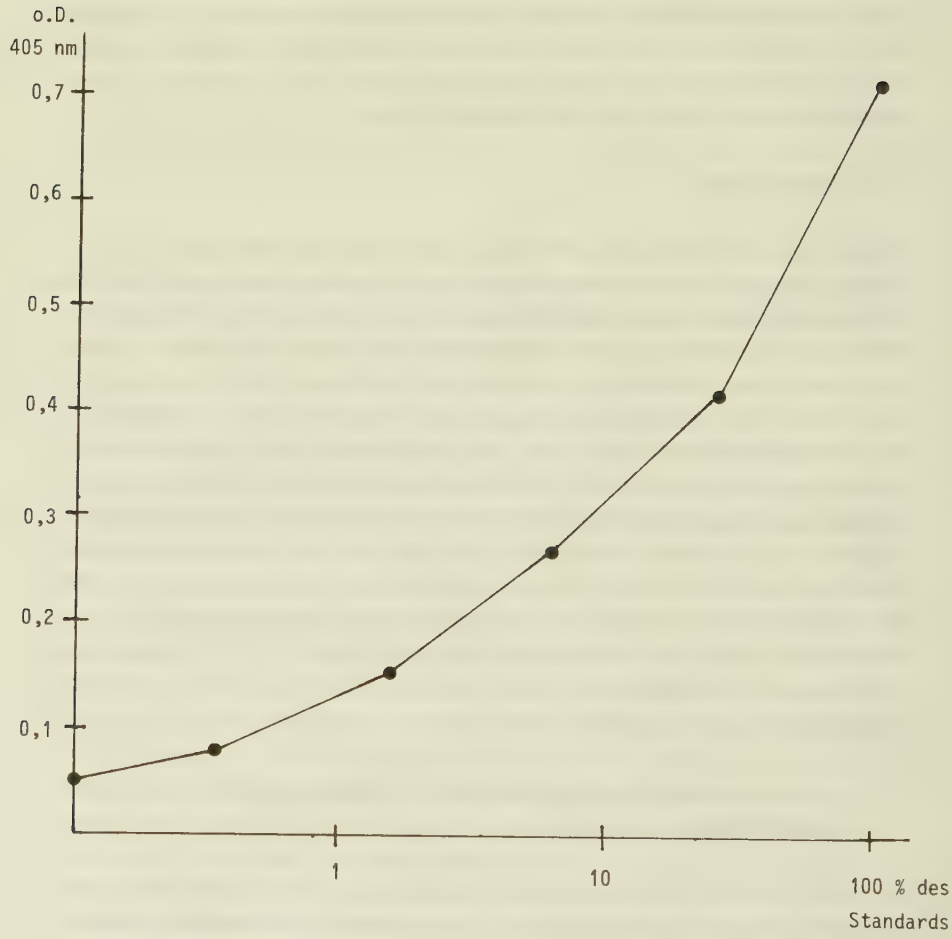



Abb. 7 Standardkurve für die Bestimmung l-Asparaginase-spezifischer Antikörper in den Seren der Patienten. Zur Erstellung der Kurve wurde ein Serum mit hohem Antikörpertiter mit gepooltem Normalserum serienmäßig verdünnt. Die Darstellung erfolgt im semilogarithmischen Maßstab.

beschrieben. Es wird weiterhin diejenige Konjugatverdünnung benutzt, deren Farbreaktion zu einer Extinktion führte, die am nächsten an 0,5 liegt. In den meisten Fällen erhielten wir für IgG einen Verdünnungsfaktor von 400 und für IgM von 200.

8. 5. Standardisierung der l-Asp-Konzentration

Es werden verschiedene Konzentrationen von l-Asp zwischen 1 und 100 E/ml an eine Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend wird der Test mit gepooltem Normalserum und einem hochtitrigen antikörperhaltigen Patientenserum durchgeführt. Es wurde diejenige l-Asp-Konzentration verwendet, bei der die Diskrimination zwischen diesen beiden Werten am deutlichsten war. Die von mir ermittelte optimale Konzentration lag bei 10 E/ml, entsprechend ca. 70 µg/ml Protein.

9. Bestimmung von l-Asp-enthaltenden spezifischen Immunkomplexen mittels solid phase ELISA

Das Testprinzip wurde schon in der Einleitung zu den ELISA Tests beschrieben (7).

9.1. Durchführung

Die Durchführung unterscheidet sich von der des unter 7. erläuterten l-Asp-Ak-Testes lediglich in folgenden Punkten:

1. Das zu untersuchende Serum wird vor dem Einsatz nur 1:10 in PBS- BSA-EDTA verdünnt.

2. Statt l-Asp werden Anti-l-Asp hochgereinigte $F(ab)_2$-Fragmente an die Mikrotiterplatte angelagert.

3. Die Auswertung erfolgt nach einer anders erstellten Standardkurve

## 9. 2. Standardisierung der l-Asp-spezifischen $F(ab)_2$-Fragmente

Als erstes werden die $F(ab)_2$-Fragmente in einer Konzentration von 0,1 bis 1,0 mg/ml in Carbonat-Bicarbonat-Puffer verdünnt auf die Mikrotiterplatte gebracht und dort durch 16 stündige Inkubation bei 4°C immobilisiert. Anschließend wird die Platte dreimal mit PBS-Tween gewaschen. Sodann werden im Paralellansatz für jede $F(ab)_2$-Verdünnungsstufe gepooltes Normalserum und ein Serum, in dem experimentell l-Asp-enthaltende Immunkomplexe hergestellt wurden, jeweils 1:10 in PBS BSA EDTA verdünnt in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Der weitere Arbeitsgang entspricht dem des l-Asp-Ak-Testes.

Für die weiteren Analysen wird diejenige $F(ab)_2$-Fragment-Konzentration verwendet, bei der die bestes Diskrimination zwischen Minimum (gepooltes Normalserum) und Maximum immunkomplexhaltiges Serum) festzustellen ist.

## 9. 3. Erstellung der Standardkurve

Zu einem Patientenserum mit nachweislich hohen Anti-l-Asp IgG-Spiegeln (1ml) wird eine definierte Menge l-Asp (1ml = 25 E) gegeben. Das Ganze wird 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschliessend erfolgt eine Zentrifugation bei 4°C und 2000g für 15 Minuten, um unlösliche Immunkomplexe zu entfernen. Der verbleibende Überstand wird aliquotiert bei - 70°C eingefroren. Für den Test wird ein Aliquot unverdünnt, 1:4, 1:16, 1:64 und 1:256 in gepooltem Normalserum verdünnt eingesetzt. Als Nullwert der Standardkurve wird die unspezifische Bindung von Normalserum an die Platte bewertet. Der Arbeitsgang zur Erstellung der Standardkurve entspricht dem oben für die Patientenseren beschriebenen.

Bei semilogarithmischer Auftragung entspricht die gemessene Extinktion des unverdünnten Standardserums 100% und die des Normalserums 0%. Dementsprechend werden die Ergebnisse der Proben in % des Standards angegeben.

Im Falle der Benutzung eines neuen Standardserums wurde die neue Standardkurve unter Berücksichtigung der Differenz der beiden unverdünnten Standardwerte erstellt.

Das geeignete Mengenverhältnis zwischen Serum und l-Asp zur Herstellung der l-Asp-enthaltenden Immunkomplexe wurde durch die Inkubation der beiden Komponenten in unterschiedlichen Relationen ermittelt. Das Verhältnis, bei dem im anschließenden Test zur Bestimmung l-Asp enthaltender Immunkomplexe die höchste Extinktion gemessen werden konnte, wurde schließlich verwendet.

## 9. 4. Messung experimentell entstandener, l-Asp enthaltender Immunkomplexe beim Kaninchen

### Zusätzliche Reagentien

Citrat-Phosphat-Puffer: 500 ml 0,1 N Zitronensäure und 400 ml 0,1 N $Na_2HPO_4$ werden auf einen pH von 5,5 eingestellt. Dazu werden 0,04% $H_2O$ gegeben.

Peroxidase konjugierter Anti-Kaninchen-IgG Antikörper (Cappel)

o-Phenylendiamin x 2 HCl

### Durchführung:

Das Testprinzip ist mit dem zur Messung von l-Asp-enthaltenden IC im Humansystem identisch. Es wird jedoch zur Bestimmung der IC ein Peroxidase Konjugierter Antikörper gegen Kaninchen IgG (Fc-spezifisch) eingesetzt. Durch die Reaktion der immobilisierten Peroxidase mit o-Phenylendiamin x 2HCl (in Citrat-Phosphat-Puffer verdünnt) kommt es nach 30 minütiger Inkubation zu einer Farbreaktion, die bei 492 nm quantitativ erfaßt werden kann.

### Standardisierung des Peroxidase konjugierten Antikörpers:

In 16 stündiger Inkubation werden 100 ng/ml Kaninchen IgG

(eigene Herstellung) in Carbonat-Bicarbonat-Puffer verdünnt auf eine Mikrotiterplatte (200µl/Vertiefung) immobilisiert. Nach Waschen der Platte mit PBS-Tween werden verschiedene Verdünnungen des Peroxidase-konjugierten-Antikörpers von 1:10000 bis 1:50000 auf die Platte pipettiert. Das weitere Vorgehen unter Verwendung von o-Phenylendiamin x 2HCL statt p-NPP ist bekannt (siehe 7.2.). Der Test wird weiterhin mit der Verdünnung durchgeführt, deren Extinktionswert im Test am nächsten bei 0,5 liegt.

## 10. Bestimmung von C3b-bindenden IgG-Immunkomplexen mittels eines solid phase ELISA

Das Testprinzip darf nunmehr schon als bekannt vorausgesetzt werden.

### 10. 1. Durchführung:

Die Durchführung dieses ELISA unterscheidet sich von den vorangehend beschriebenen in folgenden 3 Punkten:

1. Die zu untersuchenden Seren werden 1:20 in PBS-BSA-EDTA verdünnt.

2. Im ersten Schritt werden Anti-Human-C3b $F(ab)_2$-Fragmente (Cappel, Cochranville, USA) an die Mikrotiterplatte gebunden.

3. Erstellung der Standardkurve.

### 10. 2. Standardisierung der Anti-Human-C3 $F(ab)_2$-Fragmente

Die Methode zur Standardisierung entspricht der unter 8. 2. beschriebenen bezüglich der Anti-1-Asp $F(ab)_2$-Fragmente. Auch in diesem Test werden die Anti-Human-C3 $F(ab)_2$-Fragmente in Konzentrationen von 0,1 bis 1 mg/ml an die Mikrotiterplatte gebunden. Als Maximalwert dient aggregiertes Humanglobulin, an das Komplement angelagert wurde, während als Minimalwert das Serum eines gesunden Probanden diente.

Die am häufigsten ermittelte optimale $F(ab)_2$-Fragment Konzentration lag bei 0,4 mg/ml.

10. 3. Herstellung von aggregiertem Humanglobulin (AHG)

60 mg Human IgG, Cohn Fraktion II (Sigma, München) werden in 10 ml PBS gelöst. Zur Aggregation wird die Lösung 30 Minuten bei 63°C inkubiert. Unlösliche Aggregate werden anschließend durch Ultrazentrifugation für 90 Minuten bei 40000 g und 4°C entfernt. Die oberen 2/3 des Überstandes werden zur weiteren Analytik verwendet. Die löslichen IgG-Aggregate werden auf 4 mg/ml eingestellt und in Aliquots fraktioniert eingefroren.

10. 4. Erstellung der Standardkurve

Das so erstellte AHG wird mit dem Serum eines Einzelspenders, bei dem keine C3b-bindenden Immunkomplexe gemessen wurden, auf eine Konzentration von 1600µg/ml verdünnt. Mit dem gleichen Serum werden von dieser Ausgangslösung geometrische Verdünnungen bis 25 µg/ml gemacht. Die Verdünnungen werden 30 Minuten bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Hierbei erfolgt die Aktivierung des Komplementsystems durch die IgG Aggregate mit nachfolgender Anlagerung von C3b.

Die Standards werden 1:20 in PBS-BSA-EDTA verdünnt in den Test eingesetzt; sie werden auf jeder Mikrotiterplatte in Dreifachbestimmungen mitgeführt.

Als Leerwert der Standardkurve wird das Serum des zur Verdünnung des AHG verwendeten Einzelspenderserums benutzt, da bei der Durchführung des Testes mit gepooltem Normalserum durch die Aggregatbildung des Serums (diese entstand wahrscheinlich während der Inkubation im Schüttelbad) falsch erhöhte Extinktionen für den Nullwert gemessen wurden. Es wurden ca. 40 Einzelspenderseren gemessen. Zur Erstellung der Standardkurve wurden diejenigen verwendet, deren Extinktion + 10% der im Median gemessenen entsprach. Die auf diese Weise ermittelten Backgroundextinktionen betrugen zwischen 0,06 und 0,08.

Die Auftragung der gemessenen Extinktionen gegen die AHG Konzentrationen zur Erstellung der Standardkurve erfolgte semilogarithmisch.

## 11. Messung Polyethylenglykol präzipitabler Immunkomplexe

Der Test wurde weitgehend von Chia et al. (1979) übernommen.

### 11. 1. Durchführung

100µl Patientenserum werden mit 100 µl 5% PEG gemischt und 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Proben 30 Minuten bei 4°C und 2000g zentrifugiert. Dann wird der Überstand dekantiert. Das Präzipitat wird nun dreimal in 2,5%iger PEG Lösung gewaschen. Hierbei muß darauf geachtet werden, daß das Präzipitat nach jedem Waschvorgang vollständig resuspendiert wird. Bei den Waschungen erfolgt eine 15 minütige Zentrifugation bei 4°C und 2000g. Nach dem letzten Waschvorgang wird das Präzipitat in 100µl PBS aufgenommen. Auf kommerziell erhältlichen Immundiffusionsplatten (LC-Partigen Platten, Behring, Marburg) wird der Gehalt der Serumproben an makromolekularem IgG nach dem von Mancini et al. (1965) erläuterten Prinzip ermittelt.

### 11. 2. Prüfung der Testbedingungen

Die oben wiedergegebenen Testbedingungen wurden nach den Ergebnissen folgender Experimente erstellt:

Die Versuche wurde mit experimentell erstellten Immunkomplexen durchgeführt. Dabei wurden 2 ml AHG Lösung (4 mg/ml) mit 4 ml gepooltem Normalserum vermischt und 30 Minuten bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Diese Immunkomplexlösung wurde anschliessend auf folgende Ansätze verteilt:

1. Inkubation bei 4°C über 1 Stunde mit 5% PEG im Verhältnis 1:1 vermischt, anschließend Zentrifugation bei 4°C und 2000g über 30 Minuten. Messung ohne vorangehende Waschvorgänge.

2. Wie 1., jedoch 1 Waschvorgang vor der Messung.

3. Wie 1., jedoch 2 Waschvorgänge vor der Messung.

4. Wie 1., jedoch 3 Waschvorgänge vor der Messung.

5. Wie 1., jedoch 4 Waschvorgänge vor der Messung.

6. Wie 4., aber nach der Inkubation 1 stündige Zentrifugation.

7. Wie 4., aber 18 stündige Inkubation.

8. Wie 7., aber 1 stündige Zentrifugation nach der Inkubation.

9. Wie 4., aber 2 Stunden Zentrifugation nach der Inkubation.

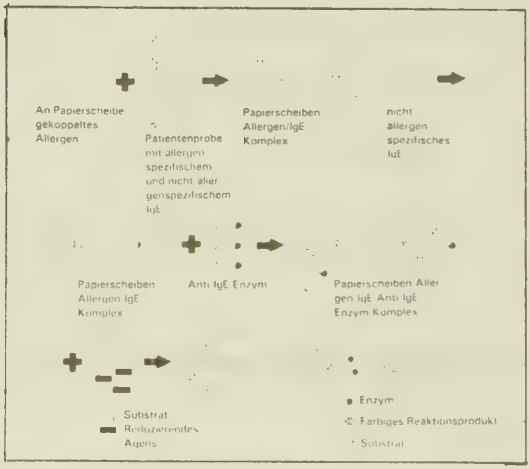
Der Gehalt der Proben an makromolekularem IgG wurde bei allen Versuchen nach Auflösung der Präzipitate in PBS auf LC Partigen Platten bestimmt.

## 12. Bestimmung spezifischer Anti-l-Asp-IgE-Antikörper.

### 12. 1. Testprinzip

Das Testprinzip ist in Abb. 8 wiedergegeben. Es handelt sich bei diesem Test um einen Enzymimmunoassay nach dem "solid phase-" Prinzip. Während der ersten Inkubation reagiert kovalent an Papierscheiben gebundene l-Asp mit spezifischem IgE in den Patientenseren. Nach den Waschvorgängen verbleibt ein Papierscheiben-Allergen/IgE- Komplex im Röhrchen gebunden. Während der zweiten Inkubation wird mit dem Enzym ß-Galaktosidase markiertes Anti-Human-IgE an das immobilisierte, l-Asp spezifische IgE gebunden. Nach dem Waschen verbleibt im Röhrchen ein Papierscheiben-Allergen/IgE-Anti-IgE-Komplex. Durch die Zugabe eines reduzierenden Agens (Glutathion) wird das Enzym aktiviert und katalysiert nun die Hydrolyse des Substrats o-Nitrophenylen-ß-Galaktosid zu gelb gefärbtem o- Nitrophenol und farbloser

Abb. 8 Testprinzip des kommerziell erhältlichen Enzym-Immuno-Assays zur Bestimmung von l-Asparaginase-spezifischen IgE-Antikörpern in den Seren der Patienten. Diese Beschreibung wurde derjenigen der Firma Pharmacia (Phadezym RAST) entnommen.



Galaktose. Die enzymatische Hydrolyse wird durch die Zugabe von Natriumbicarbonat gestoppt. Die gemessene Extinktion bei 420 nm ist der Konzentration an spezifischem IgE direkt proportional.

12. 2. Reagentien

Alle in diesem Test benutzten Reagentien sind von der Firma Pharmacia direkt erhältlich.

Waschlösung: 16 ml Tween 20 werden in 100 ml physiologische Kochsalzlösung gegeben. Die Menge reicht für ca. 60 Bestimmungen.

Pufferlösung: Die Puffersubstanz (vorgefertigt) wird in 100 ml Waschlösung gelöst. Die Pufferlösung hat dann einen pH Wert von 7,4.

Enzym-Anti-IgE-Lösung (gebrauchsfertig).

Entwicklerlösung: Der Inhalt des Fläschchens mit der Entwicklersubstanz (0-Nitrophenyl-ß-Galaktosid und Glutathion, lyophylisiert) wird mit dem gesamten Volumen des Puffers für das Entwicklerreagenz rekonstituiert.

Unterbrecherlösung: 4,2g Natriumcarbonat werden durch die Zugabe von 100 ml Aqua dest. in einem Becherglas aufgelöst.

Die Papierscheibchen mit kovalent gebundener l-Asp wurden als Sonderanfertigung von der Firma Pharmacia geliefert. Das Kopplungsprinzip ist patentiert.

12. 3. Durchführung des Testes:

Auf den Boden jedes Röhrchens werden gemäß dem Testschema die l-Asp enthaltenden Papierscheiben gelegt.

- 50µl der zu untersuchenden Probe werden in die Röhrchen pipettiert, wobei keine Flüssigkeit an der Röhrchenwand hängen bleiben soll. Alle Röhrchen werden mit Alu-Folie abgedeckt und drei Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert.

- Je Röhrchen werden nun 2,5 ml Waschlösung zugegeben. Nach 10 minütigem Stehenlassen wird die Flüssigkeit mittels eines Multi-Absaugblockes (Pharmacia)entfernt. Der Waschvorgang wird nun zweimal wiederholt.

- 50µl des Anti-IgE-Enzym-konjugierten Antikörpers werden auf das Papierscheibchen pipettiert. Nach Abdeckung der Röhrchen erfolgt eine Inkubation bei Zimmertemperatur für 16 Stunden.

- Erneutes dreimaliges Waschen der Proben wie oben beschrieben.

- 200µl Entwicklerlösung werden auf die Scheiben sowie zwei weitere Leerwertröhrchen pipettiert.

- Die Röhrchen werden erneut abgedeckt und 120 Minuten bei 37°C inkubiert.

- 1000µl Unterbrecherlösung werden in jedes Röhrchen gegeben. Dieses soll in der gleichen Reihenfolge und Geschwindigkeit wie die Zugabe der Entwicklerlösung erfolgen. Anschließend wird alles gut gemischt.

Die Extinktionen werden bei 420 nm mit einem Photometer gegen die Leerwerte gemessen. Die Auswertung erfolgt anhand einer Standardkurve, die wie nachfolgend beschrieben erstellt wird.

## 12. 4. Erstellung der Standardkurve

Ein Patientenserum mit einem besonders hohen Titer an spezifischem IgE wird als Standard benutzt. Das Serum wird unverdünnt, 1:4, 1:16, 1:64 und 1:256 in gepooltem Normalserum verdünnt im Test eingesetzt. Als Nullwert wird die unspezifische

Bindung von IgE aus dem gepoolten Normalserum an die RAST-Scheiben ermittelt. Die Standardwerte werden als Doppelwerte im Testansatz eingesetzt. Die gemessenen Extinktionen werden in semilogarithmischen Maßstab gegen die eingesetzten Konzentrationen des Standards aufgetragen. Die Ergebnisse werden in % des Standards angegeben.

## 13. In vitro Experimente

### 13. 1. Nachweis der Spezifizität des neuen ELISA zur Messung l-Asp enthaltender IgG-Immunkomplexe

Der Nachweis der Spezifizität des ELISA wird in folgenden Arbeitsschritten erbracht:

a) Es werden experimentell Immunkomplexe aus l-Asp und Anti-l-Asp Antikörpern hergestellt. Die Experimente werden mit Kaninchenantikörpern durchgeführt. Es werden unterschiedliche Antigen-Antikörperrelationen untersucht. Durch Zentrifugation werden unlösliche Immunkomplexe entfernt.

b) Die so hergestellten Immunkomplexe werden mittels Gelfiltration getrennt und die gesammelten Fraktionen werden auf ihren Gehalt an spezifischen Immunkomplexen mittels des neuen ELISA Testes untersucht. Das selbe Procedere wird auch für die Antikörper alleine durchgeführt, nicht aber für das reine Antigen, da die Immunkomplexe in Antigenüberschuß gebildet werden, so daß neben immunkomplexiertem Antigen auch freies Antigen nach der Gelfiltration in den entsprechenden Fraktionen gefunden werden kann und diese dann ebenfalls auf spezifische Immunkomplexe untersucht werden.

zu a)
Zur Herstellung l-Asp enthaltender Immunkomplexe werden l-Asp (Crasnitin) und experimentell gewonnene Kaninchen Anti-l-Asp-IgG Antikörper in folgenden Mengenrelationen zusammengegeben:

Tab. 2a Mischungsverhältnisse zwischen l-Asp und Anti-l-Asp-Antikörpern zur experimentellen Herstellung von Immunkomplexen

| Anti-l-Asp IgG | l-Asp |
|---|---|
| 250µl | 200µl (1000E/ml) |
| 250µl | 200µl ( 500E/ml) |
| 250µl | 100µl ( 500E/ml) |
| 300µl | 100µl ( 250E/ml) |
| 900µl | 100µl ( 250E/ml) |
| 1900µl | 100µl ( 250E/ml) |
| 1900µl | 100µl ( 125E/ml) |

Diese Mischungen werden jeweils 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 4 °C und 2000g zur Entfernung unlöslicher Komplexe zentrifugiert. Im Überstand wurden die Proteinkonzentration nach Lowery sowie die funktionelle l-Asp-Aktivität und der Antigengehalt bestimmt. Diese Bestimmungen können nicht im Präzipitat durchgeführt werden, da dieses z.B. mit 5 molarer Kochsalzlösung nicht wieder auflösbar ist. Eine Lösung der Präzipitatbindungen mit KSCN kommt nicht in Frage, da dieses mit den Bestimmungen der l-Asp-Aktivität wie auch des Proteingehaltes interferiert. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Proteinmengen und der verwendeten l-Asp-Konzentration in der Ausgangslösung können Präzipitatbildung und l-Asp-Aktivitäts-Verlust abgeschätzt werden.

Die Wahl der oben verwendeten Mischungen ergibt sich aus der groben Abschätzung des Äquivalenzpunktes, wobei davon auszugehen ist, daß an diesem Punkt die Löslichkeit von Immunkomplexen am geringsten und der Proteinverlust im Überstand am größten ist.

zu b)

Ausgehend von den oben durch die Proteinfällungsexperimente ermittelten Bedingungen für Antigen bzw. Antikörperüberschuß werden folgende Mischungen hergestellt und durch Gelfiltration aufgetrennt:

Antigenüberschuß:

0,4 ml l-Asp (2000 E/ml) werden mit 1 ml Anti-l-Asp IgG (550 mg/dl) vermischt

Äquivalenzpunkt:

0,4 ml l-Asp (500 E/ml) werden mit 1 ml Anti-l-Asp IgG (550 mg/dl) vermischt

Antikörperüberschuß: Mischungen die in dieser Situation hergestellt wurden enthielten sowenig spezifische Immunkomplexe, daß sie bei Gelfiltration nicht mehr nachzuweisen sind.

Die beschriebenen Mischungen werden über eine Sephadex G200 Säule eluiert. In den Eluaten werden der Proteingehalt, der Gehalt an spezifischen Immunkomplexen sowie die enzymatische Aktivität der l-Asp gemessen.

14. Vergleich verschiedener l-Asp-Präparationen

Es wurden folgende l-Asp-Präparationen auf verschiedene Eigenschaften hin untersucht: E. coli Asp (Crasnitin, Bayer) und Leunase (Kyowa Hakko Kogyo LTD, Tokyo Japan), Erwinia Asp (The centre for Applied Microbiology and Research, Salisbury, England), PEG behandelte Asp (Enzon, New Jersey).

Folgende Untersuchungen werden durchgeführt:

a) Die Spezifische Aktivität in den Präparaten wird durch die gleichzeitige Bestimmung von Proteingehalt und Enzymaktivität festgelegt.

b) Zur Festlegung der antigenen Eigenschaften wird die Kreuzreaktivität der verschiedenen Präparate mit Kaninchen und menschlichen Antikörpern bestimmt.

In der Ouchterlony Diffusion werden unverdünnt Antikörper vom Kaninchen gegen jeweils 200 E/ml Leunase und Crasnitin, sowie 500 bzw. 20000E/ml Erwinia Asp und schließlich 500 E/ml PEG modifiziert Asp inkubiert. Das Ergebnis wird nach 24 bzw. 48 Stunden abgelesen.

Im ELISA werden verschiedene Patientenseren nach Immobilisation der verschiedenen l-Asp-Präparationen an die Mikrotiterplatte (gleiche Proteinmengen) auf den Gehalt an Antikörpern mit der Fähigkeit zur Bindung an die l-Asp-Präparate untersucht. Der immobilisierte Proteingehalt wird dadurch überprüft, daß jeweils 1mg/ml der l-Asp Präparate 16 Stunden bei 4°C an die Platte immobilisiert werden. Aus dem Proteingehalt im Überstand und der eingesetzten Proteinmenge kann der gebundene Anteil berechnet werden.

c) Die Auftrennung der l-Asp-Präparate in Isoenzyme wird durch die Elution derselben über eine HPLC. Hierzu werden die Proben auf einen etwa gleichen Proteingehalt eingestellt (nach steriler Filtration durch einen 0.22µm Milipore Filter). 100µl jeder Probe werden auf eine HPLC Säule (LKB, Ultro Pac, TSK SW 4000) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 0,1 m Phosphatpuffer pH 6,3 und einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/ min. Das Elutionsprofil wird mit einem Papiervorschub von 5 mm/min photometrisch aufgezeichnet. In den gesammelten Fraktionen wurden Proteingehalt und enzymatische l-Asp-Aktivität ermittelt. An Hand einer Molekulargewichtsmarkierung wird das MWG der Isoenzyme abgeschätzt.

# III. Resultate

## A. Untersuchungen zu methodischen Problemen

### 1. Funktionelle l-Asparaginase Bestimmung:

Für die reproduzierbare Durchführung des Testes ist es notwendig, die vom Hersteller gemachten Angaben bezüglich der gelieferten Enzymaktivität zu überprüfen, da nur bei einer Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen die gelieferten Präparationen als Standard für den Test dienen konnen. Durch den Vergleich von gemessener l-Asp-Aktivität und der Farbreaktion im Test, die durch eine bestimmte Substratmenge erzeugt wird (hierzu diente Ammoniumsulfat, aus dem im basischem Milleu Ammoniak freigesetzt wird, welches mit dem Nesslerschen Reagenz genauso wie das aus Asparagin freigesetzte Ammoniak reagiert), können die Herstellerangaben bestätigt werden (Abb. 9).

Ein weiteres Problem besteht darin auszutesten, in wieweit das verdünnende Medium für die l-Asp einen Einfluß auf die Aktivitätsmessung hat. Ein Vergleich der Verdünnung von l-Asp in Aqua dest. und in gepooltem Normalserum zeigt, daß bei Verdünnung in Serum im Durchschnitt ca. 3-5% höhere Extinktionen gemessen werden (Abb. 10).

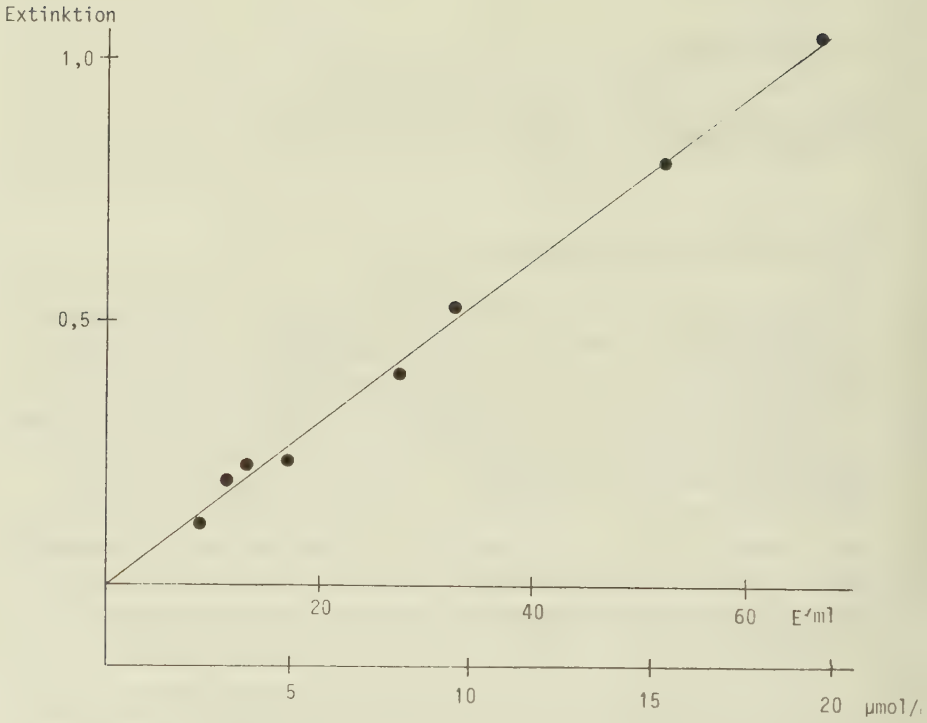



Abb. 9 Vergleich der Extinktionen, die durch die Reaktion einer bestimmten Me
Ammoniak, das aus Ammoniumsulfat im basischen Medium freigesetzt wurde
(●) mit der Standardkurve zur Messung der l-Asparaginase-Aktivität bei
Verdünnung der l-Asparaginase in Aqua dest.

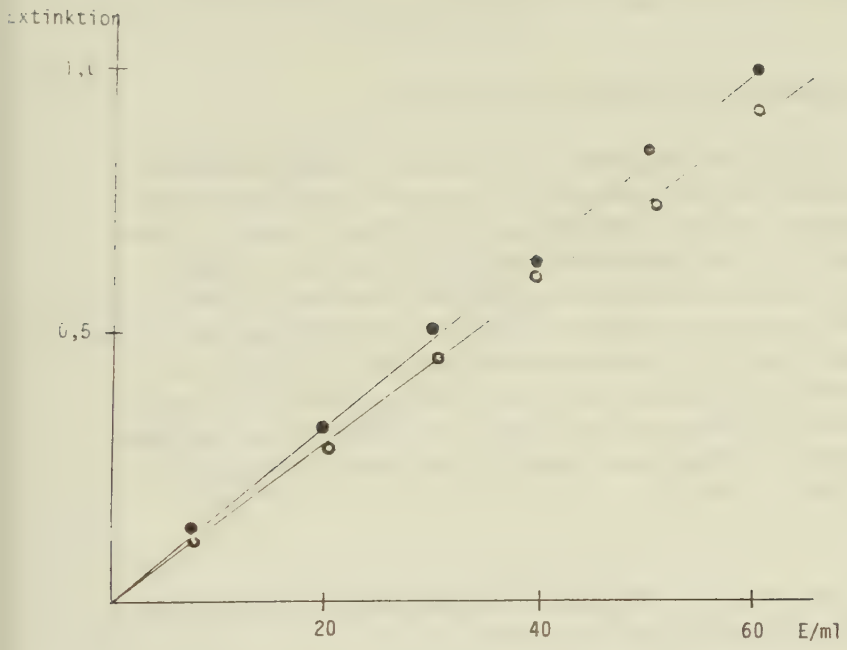



Abb. 10 Vergleich der Standardkurven zur Messung von l-Asparaginase-Aktivitäten bei Verdünnung der l-Asparaginase in Aqua dest. (○) bzw. in gepooltem Normalserum (●).

## 2. ELISA zur Messung l-Asp-enthaltender IgG Immunkomplexe

### 2. 1. Nachweis der Spezifizität des Testes:

Um die Spezifizität des Testes zu ermitteln, muß die unspezifische Bindung von Antigen und Antikörper ausgeschlossen werden. Hierzu werden lösliche Immunkomplexe aus l-Asp (Crasnitin) und Anti-l-Asp-IgG (vom Kaninchen) hergestellt und durch Gelfiltration von freiem Antigen und Antikörper getrennt. In den Fraktionen werden der Gehalt an spezifischen Immunkomplexen, die Proteinmenge und die l-Asp-Aktivität bestimmt. Es zeigt sich, daß vom Immunkomplextest weder freies Antigen noch Antikörper erfaßt werden. Interessant ist, daß in den Fraktionen, in denen Immunkomplexen nachgewiesen werden, l-Asp noch Enzymaktivität besitzt (Abb. 11 und 12).

### 2. 2. Nachweisbarkeit löslicher Immunkomplexe in verschiedenen Antigen-Antikörper-Relationen:

Ein Patientenserum mit besonders hohem Antikörpertiter wird mit verschiedenen Mengen an l-Asp inkubiert und die löslichen Immunkomplexe werden im Testansatz bestimmt. Es zeigt sich, daß sowohl in Antikörper wie auch in Antigenüberschuß praktisch keine Immunkomplexe nachzuweisen waren. Dieses Phänomen kann am besten bei einer l-Asp-Konzentration im Serum von ca. 10 bis 25 E/ml demonstriert werden (Abb. 13).

### 2. 3. Reproduzierbarkeit des Testes:

Es werden eine Anzahl von Seren zu verschiedenen Zeitpunkten und auf verschiedenen Mikrotiterplatten auf den Gehalt an spezifischen Immunkomplexen untersucht (Tab. 2). Es zeigt sich, daß selbst unter Verwendung eines semiquantitativen Auswertungsmaßstabes keine ausreichende Reproduzierbarkeit zu erzielen ist (Tab. 3). Da aber der Anteil falsch positiver wie falsch nega-

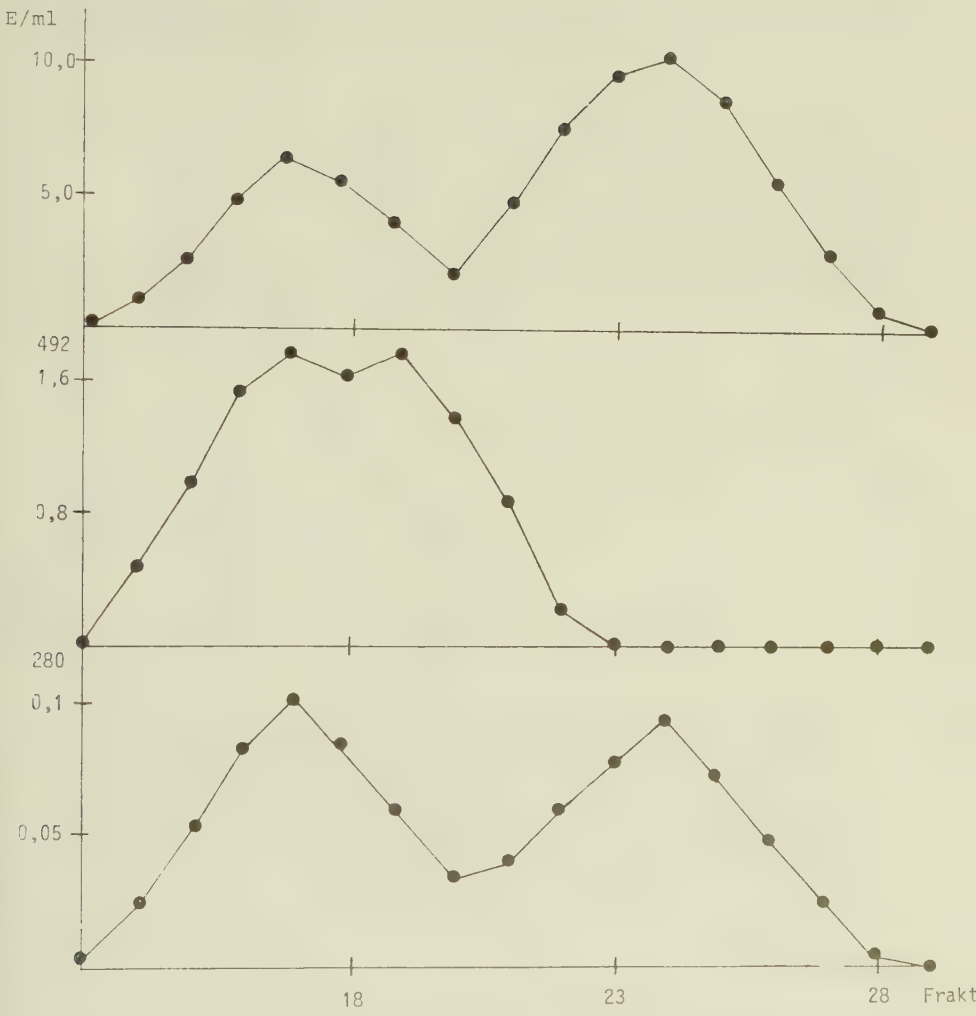



Abb. 11 Elution von Anti-l-Asparaginase-IgG-l-Asparaginase Immunkomplexen unter Antigenüberschußbedingungen. Die Immunkomplexe werden durch die Inkubation von Antigen und Antikörper für 30 Minuten bei 37°C experimentell erzeugt. Unlösliche Komplexe werden durch Zentrifugation entfernt. Die löslichen Immunkomplexe werden über eine Sephadex G 200 Säule eluiert. Dabei werden für die einzelnen Fraktionen die l-Asparaginase-Aktivität (oben), der Gehalt an l-Asparaginase-enthaltenden Immunkomplexen (mitte) und der Proteingehalt bei 280 nm (unten) bestimmt.

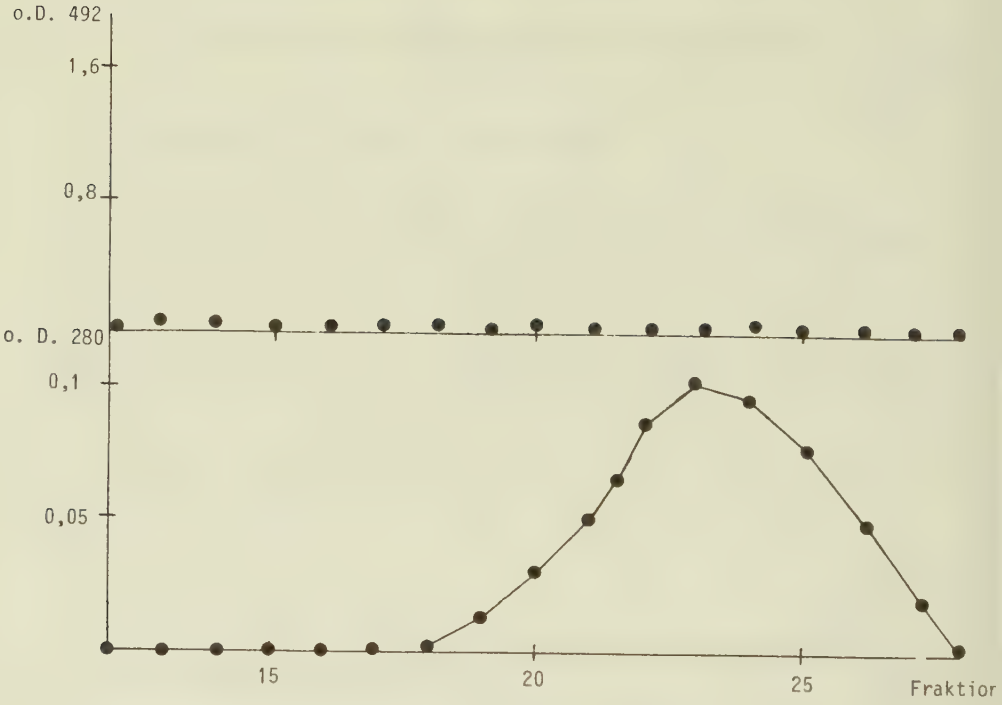



Abb.12 Elution von Anti-l-Asparaginase-IgG vom Kaninchen über eine Sephadex G200 Säule. Es werden 1 ml Fraktionen gesammelt. In diesen wurde die Proteinkonzentration bei 280 nm (unterer Teil) und der Gehalt unspezifischer Bindung im ELISA Test zur Ermittlung spezifischer l-Asparaginase-enthaltender Immunkomplexe für jede Fraktion ermittelt.

tiver Resultate in der Größenordnung von anderen Immunkomplex-testen liegen, werden die Patientenseren mit diesem Test gemessen, um eine grobe Orientierung über die relativen Veränderungen der Komplexe zu gewinnen.

Tab. 3 Abweichungen in der Analyse spezifischer ɪ-Asp-enthaltender Immunkomplexe zwischen Doppelwertbestimmungen, die auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt wurden unter Berücksichtigung eines semiquantitativen Auswertungsschemas Dargestellt ist die Anzahl von übereinstimmenden bzw. abweichenden Bestimmungen. In Gruppe I werden alle Immunkomplexergebnisse mit einem Titer von 0% des Standards zusammengefaßt, in Gruppe II betragen die Spiegel zwischen 0 und 1%, in Gruppe III zwischen 1 und 15% und in Gruppe IV sind die Spiegel größer als 15%.

| | | 1. Bestimmung | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Gruppe | I | II | III | IV |
| 2. Bestimmung | I | 8 | 6 | 0 | 0 |
| | II | 0 | 12 | 4 | 0 |
| | III | 0 | 1 | 7 | 0 |
| | IV | 0 | 0 | 0 | 0 |

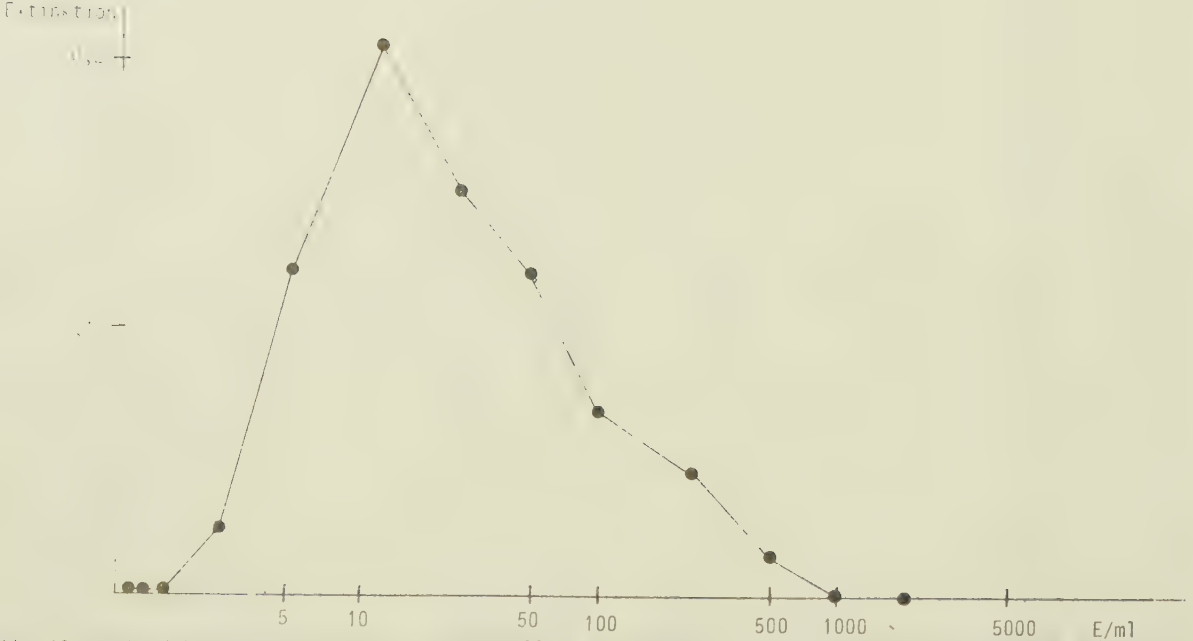



Abb. 13 Nachweisbarkeit experimentell hergestellter Immunkomplexe aus Patientenserum mit einem hohen Anti-l-Asp-IgG Titer und l-Asp in verschiedenen Antigen-Antikörper-Relationen. In der Abbildung sind die Endkonzentrationen der eingesetzten l-Asp-Mengen sowie die im ELISA gemessenen Extinktionen aufgetragen.

b. 2 Überprüfung des ELISA zur Messung ıl-Asp-enthaltender Immunkomplexe. Es werden eine Anzahl Patientenseren unter verschiedenen Bedingungen auf solche Komplexe hin untersucht. Die Konzentrationen sind in % des Standards angegeben. Bei Ansatz I werden die verdünnten Seren im Doppelansatz auf eine ELISA Platte gebracht. in Ansatz II werden dieselben Verdünnungen auf eine andere Mikrotiterplatte gegeben, während in Ansatz III eine neue Verdünnung der Seren am gleichen Tage untersucht wird In Ansatz IV wird die Bestimmung an einem anderen Tag durchgeführt.

| | Ansätze | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | I | | II | III | IV |
| Serum Nr. | a | b | | | |
| 1 | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,5 | 0,8 |
| 2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,3 | 0,0 |
| 3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 6 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 7 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,2 | 0,0 |
| 8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,0 |
| 9 | 0,0 | 0,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 10 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 11 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 |
| 12 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 13 | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 0,8 |
| 14 | 0,3 | 0,5 | 0,8 | 1,0 | 0,7 |
| 15 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,5 |
| 16 | 0,2 | 0,5 | 0,2 | 1,2 | 1,2 |
| 17 | 0,7 | 0,7 | 0,2 | 0,6 | 1,5 |
| 18 | 0,0 | 0,2 | 0,2 | 0,6 | 1,2 |
| 19 | 0,7 | 0,7 | 1,6 | 8,0 | 6,0 |
| 20 | 0,7 | 0,9 | 0,8 | 1,4 | 0,8 |
| 21 | 0,6 | 0,5 | 0,7 | 9,0 | 3,0 |
| 22 | 0,0 | 0,3 | 0,5 | 1,4 | 1,2 |
| 23 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 5,0 |
| 24 | 0,3 | 0,4 | 0,6 | 2,3 | 5,5 |
| 25 | 0,6 | 1,1 | 1,5 | 3,3 | 4,0 |
| 26 | 0,3 | 1,0 | 0,8 | 1,6 | 4,6 |
| 27 | 0,9 | 1,3 | 0,7 | 1,5 | 1,0 |
| 28 | 1,0 | 1,0 | 0,2 | 2,6 | 2,0 |
| 29 | 0,5 | 2,0 | 0,6 | 4,0 | 0,7 |
| 30 | 0,5 | 1,2 | 1,0 | 4,0 | 0,9 |
| 31 | 0,5 | 1,5 | 0,6 | 10,0 | 0,6 |
| 32 | 6,0 | 8,2 | 4,5 | 70,0 | 0,9 |
| 33 | 1,0 | 3,0 | 0,5 | 30,0 | 0,6 |
| 34 | 2,5 | 4,1 | 1,7 | 5,5 | 1,2 |
| 35 | 1,6 | 1,7 | 0,8 | 0,7 | 1,8 |
| 36 | 2,0 | 2,6 | 1,8 | 7,0 | 3,0 |
| 37 | 2,5 | 4,1 | 1,7 | 4,0 | 3,0 |
| 38 | 1,0 | 2,5 | 2,0 | 10,0 | 3,4 |

3. PEG präzipitable Immunkomplexe:

Um für eine routinemäßige Durchführung die am besten geeigneten Bedingungen wählen zu können, werden verschiedene Testansätze durchgeführt. Aggregiertes Humanglobulin (die Herstellung wurde bei den Ausführungen zu den C3b-bindenden Immunkomplexen erläutert) wird mit gepooltem Normalserum inkubiert, um lösliche Immunkomplexe herzustellen, die unter verschiedenen Bedingungen im Testansatz analysiert werden. Es zeigt sich, daß die nachweisbare Immunglobulinkonzentration durch die ersten drei Waschvorgänge mit PEG- Lösung deutlich vermindert wird, d.h. der Anteil an Verunreinigungen mit monomerem IgG im Präzipitat nimmt ab. Da die Inkubationszeit und die Zentrifugation vor den Waschvorgängen praktisch keinen Einfluß auf die Bestimmung haben, wird die für die Routinemäßige Durchführung des Testes einfachsten Bedingungen ausgewählt:

1. Inkubation der Serumprobe mit 5%igem PEG für 1 Stunde bei 4°C.
2. Anschließende Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C und 2000g.
3. Drei Waschvorgänge mit 2,5%igem PEG.

Tab. 4 Einfluß verschiedener Testbedingungen auf den Nachweis PEG-präzipitabler Immunkomplexe. Die in den Untersuchungen eingesetzten Immunkomplexe werden aus aggregiertem Humanglobulin (1mg/ml) und gepooltem Normalserum durch 30 minütige Inkubation bei 37°C hergestellt. Die Teste werden in Doppelansätzen ausgeführt. Die Immunglobulinkonzentration der durch PEG-Fällung gewonnenen Präzipitate werden nach Lösung in PBS auf LC-Partigenplatten der Firma Behring gemessen.

| Ansatz | Bedingungen | | | Immunglobulinkonzentratio | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Inkubation | Zentrifugation | Waschungen | mg/dl | |
| a | 1 Stunde | 30 Minuten | 0 | 43,5 | 47,5 |
| b | 1 Stunde | 30 Minuten | 1 | 15,5 | 16,0 |
| c | 1 Stunde | 30 Minuten | 2 | 5,1 | 5,1 |
| d | 1 Stunde | 30 Minuten | 3 | 4,3 | 4,3 |
| e | 1 Stunde | 30 Minuten | 4 | 4,3 | 4,3 |
| f | 1 Stunde | 1 Stunde | 3 | 5,1 | 5,6 |
| g | 18 Stunden | 30 Minuten | 3 | 5,1 | 5,9 |
| h | 18 Stunden | 1 Stunde | 3 | 5,1 | 5,9 |
| i | 1 Stunde | 2 Stunden | 3 | 4,5 | 3,9 |

B) Ergebnisse der Untersuchungen bei Patienten

1. Spezifische Antikörper gegen l-Asp:

In Abb. 14 ist die Entwicklung der Anti-l-Asp-IgG-Antikörper in der Induktionsphase dargestellt, die Ergebnisse der Reinduktionsphase sind nicht dargestellt, da in dieser Phase nur ein sehr kleines Patientenkollektiv vollständig durchuntersucht werden konnte. Die Mediane der IgG-Antikörperspiegel liegen bei den Patienten vor den ersten 3 l-Asp-Gaben innerhalb des Normalbereiches. Signifikante Veränderungen der Titer während der Infusionen werden nicht beobachtet. Eine deutliche Zunahme der medianen Spiegel ist sowohl von der 2. zur 3. wie auch von der 3. zur 4. Infusion zu beobachten. Vor der 4. Infusion ist der Median deutlich über den Normalbereich hinaus erhöht. Während dieser 4.Infusion kommt es im Median zu einer deutlichen Spiegelreduktion.

Für die einzelnen Patienten ergibt sich folgendes Bild: Bei Patienten ohne allergische Reaktion auf l-Asp kommt es in 12 von 15 Fällen zu einer kontinuierlichen Zunahme des Antikörperspiegels von der ersten zur vierten l-Asp-Infusion. Bei den verbleibenden Patienten kann keine eindeutige Zunahme registriert werden. Die Beobachtung für die Patienten mit allergischen Reaktionen sind in einem gesonderten Kapitel unter Berücksichtigung der Patienten, die in der Reinduktionsphase untersucht wurden, zusammengefaßt.

Im Gegensatz zu den IgG Antikörpern spielen die IgM Antikörper eine weit geringere Rolle. Erst vor der vierten l-Asp-Infusion sind im Median erhöhte Antikörperspiegel nachzuweisen. Nur während dieser Infusion kommt es auch im Median zu einer deutlicher Titerreduktion. Ein weiterer Unterschied zu den IgG-Antikörpern besteht darin, daß nur 5 Patienten einen kontinuierlichen Anstieg der Spiegel erkennen lassen (Abb. 15).

Die geringste Bedeutung in Bezug auf allergische Reaktionen bei den Patienten kommt den IgE- Antikörpern zu. Im Median sind zu

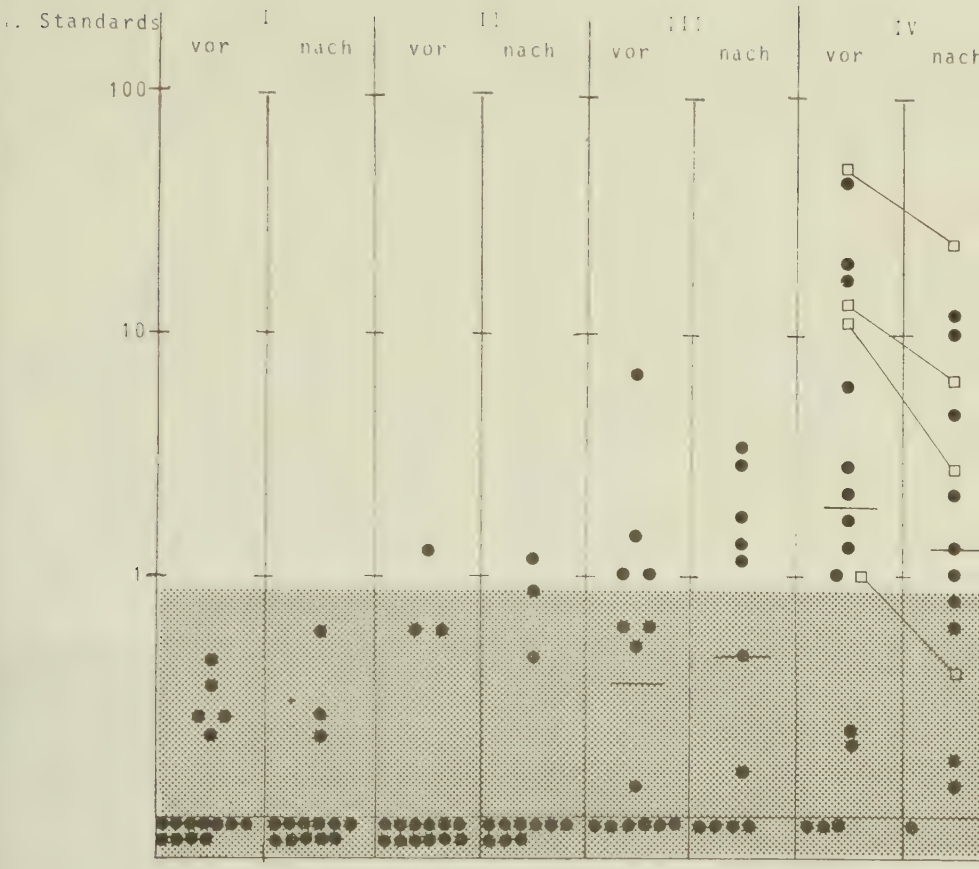



Abb. 14 Spezifische Anti-l-Asp-IgG-Antikörperspiegel bei 22 Kindern mit ALL, die im Rahmen des CoALL 82 Protokolles 4 Gaben von je 3000E/Kg KG l-Asp erhalten. Die Antikörperspiegel werden vor und nach den Infusionen bestimmt. und in % des Standards angegeben. Die Mediane sind durch Querbalken gekennzeichnet, der Kontrollbereich gesunder Probanden ist schraffiert. Die Titer der Patient mit allergischen Reaktionen sind durch Quadrate hervorgehoben.

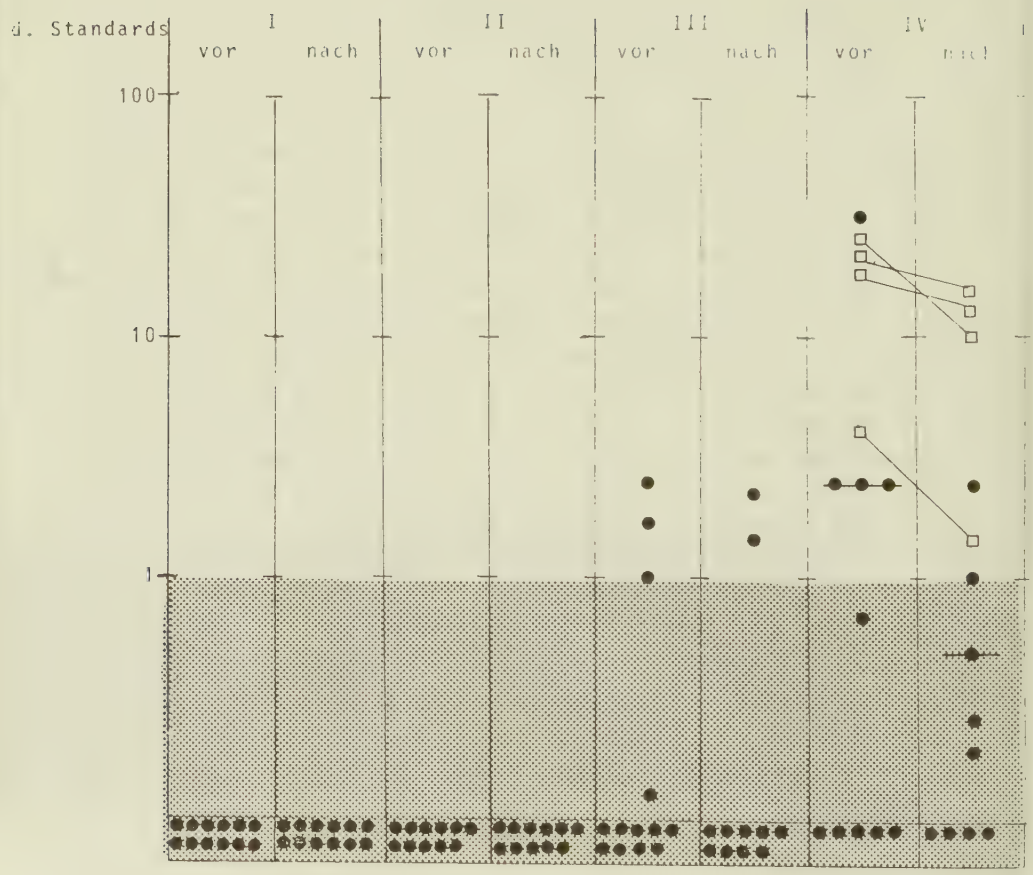



Abb. 15 Spezifische Anti-l-Asp-IgM-Spiegel bei 22 Kindern mit ALL, die im Rahmen des CoALL 82 Protokolles 4 Gaben von je 3000E/kgKG l-Asp erhalten. Die Antikörperspiegel werden vor und nach den Infusionen bestimmt und in % des Standards angegeben. Die Mediane sind durch Querbalken gekennzeichnet, der Kontrollbereich gesunder Probanden ist schraffiert. Die Titer der Patienten mit allergischer Reaktion sind durch Quadrate hervorgehoben.

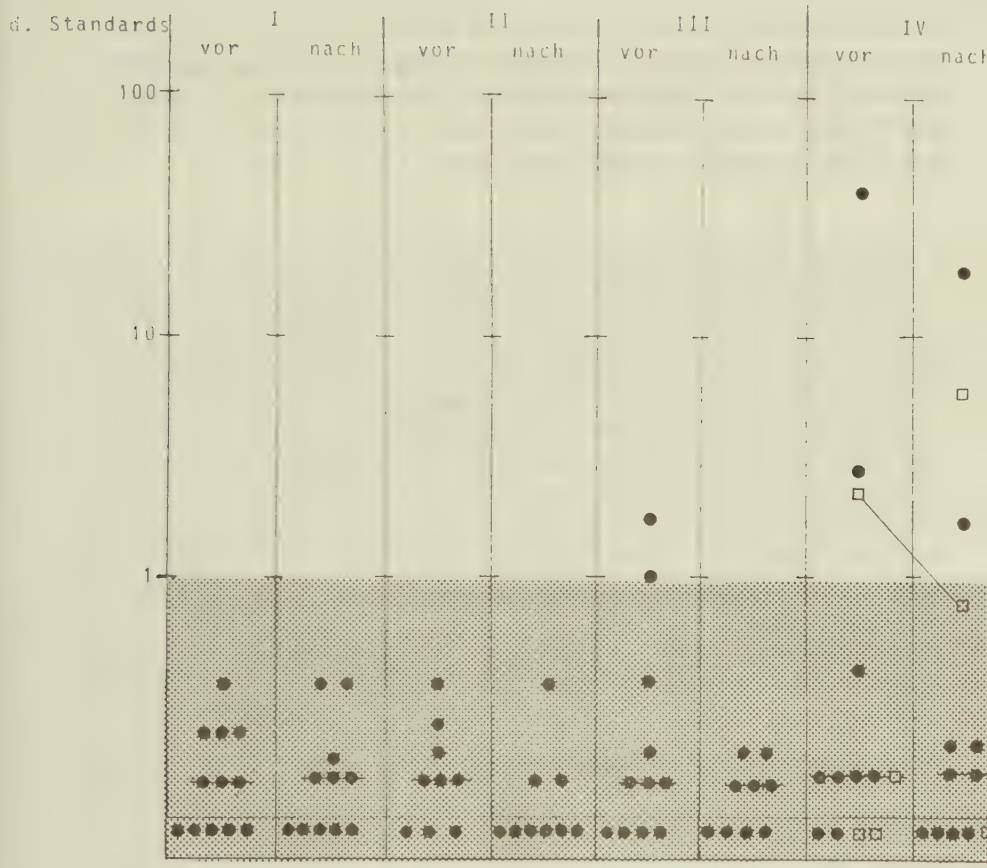



Abb. 16 Spezifische Anti-l-Asp-IgE-Antikörperspiegel bei 22 Kindern mit ALL, die im Rahmen des CoALL 82 Protokolles 4 Gaben von je 3000E/kgKG l-Asp erhalten. Die Antikörperspiegel werden vor und nach den Infusionen bestimmt. Die Median sind durch Querbalken gekennzeichnet, der Kontrollbereich gesunder Erwachsen ist schraffiert. Die Titer der Patienten mit allergischer Reaktion sind durch Quadrate hervorgehoben.

keinem Zeitpunkt der Induktionsphase erhöhte Titer nachzuweisen. Nur zwei Patienten ohne allergische Reaktion auf l-Asp entwickeln überhaupt relevante Antikörperspiegel. Bei Patienten mit allergischen Reaktionen kann bei drei Kindern die Entwicklung dieser Antikörper beobachtet werden (Abb. 16)

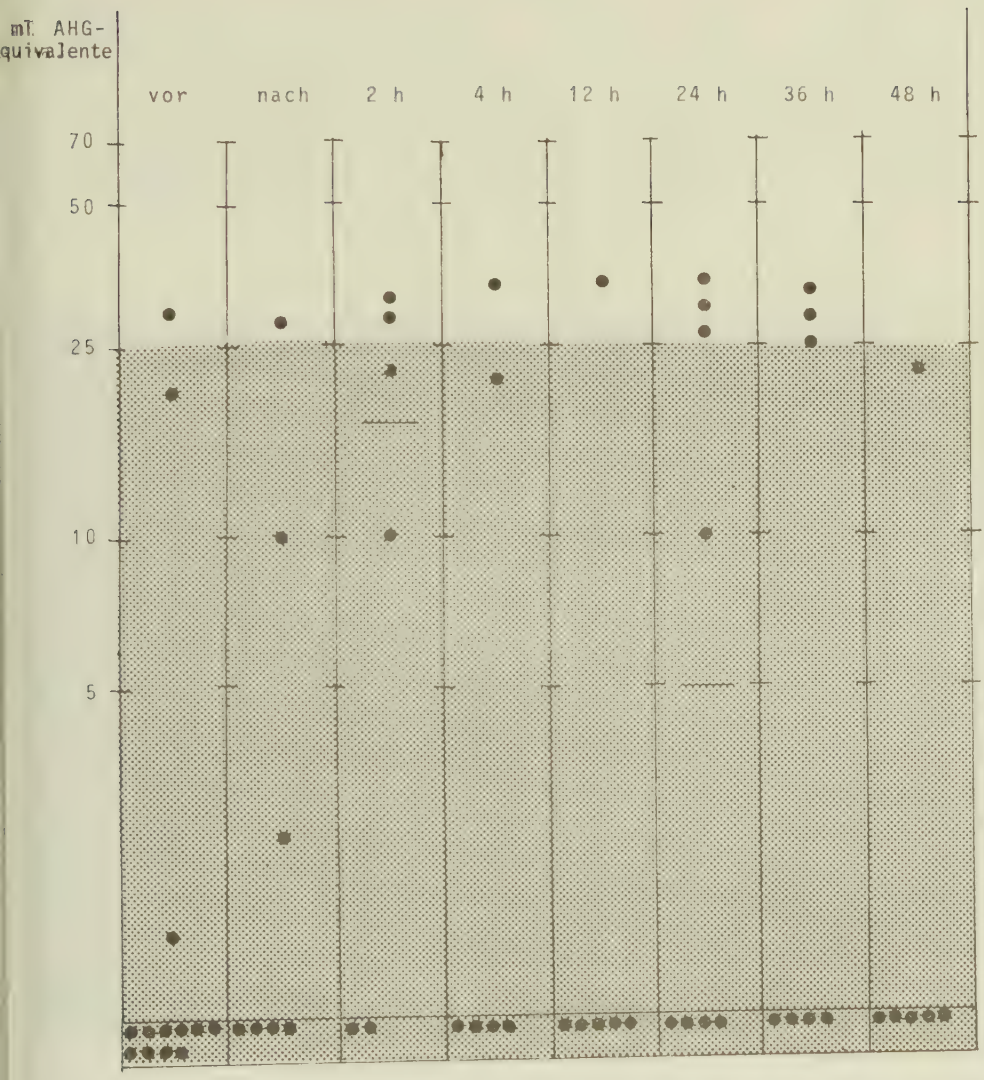
2. Immunkomplexuntersuchungen während der l-Asp-Behandlung in der Induktionsphase:

Trotz der geringen Reproduzierbarkeit des spezifischen ELISA werden die Patientenseren mit diesem Test untersucht und auf ihren Gehalt an l-Asp-enthaltenden IgG-Immunkomplexen analysiert. Die Auswertung soll nicht unter quantitativen sondern nur unter qualitativen Gesichtspunkten erfolgen. Bei dieser Untersuchung finden sich vor der l-Asp-Behandlung bei keinem Patienten spezifische Immunkomplexe. Unter der Therapie kommt es bis zur vierten Infusion zu einer deutlichen Zunahme positiver Resultate. Es fällt auf, daß die meisten positiven Titer zwischen 24 und 36 Stunden nach der l-Asp-Applikation ermittelt werden können.

Die im PEG Präzipitationstest gemessenen Immunkomplexe können nur vereinzelt nachgewiesen werden. Eine tendenzielle Zunahme im Verlaufe der l-Asp-Behandlung kann ebenfalls nicht ermittelt werden.

Demgegenüber können C3b-bindende Immunkomplexe wesentlich häufiger gefunden werden, wenn auch nur mit niedrigen Titern. Weder eine Zunahme der Immunkomplextiter von der ersten zur letzten Infusion noch eine eindeutige Immunkomplexentstehung kann bis auf wenige Ausnahmen beobachtet werden (Abb. 17 a-d).

Eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der drei verwendeten Immunkomplexmethoden besteht nicht.




17a C3b-bindende IgG-Immunkomplexe vor und nach l-Asp-Gabe bei 14 Kindern mit ALL. Die Spiegel sind in µg AHG-Äquivalenten/ml Lösung angegeben. Die Mediane sind durch Querbalken gekennzeichnet, der Kontrollbereich gesunder Probanden ist schraffiert. Die negativen Nachweise sind im Kasten unter der Abbildung aufgeführt.

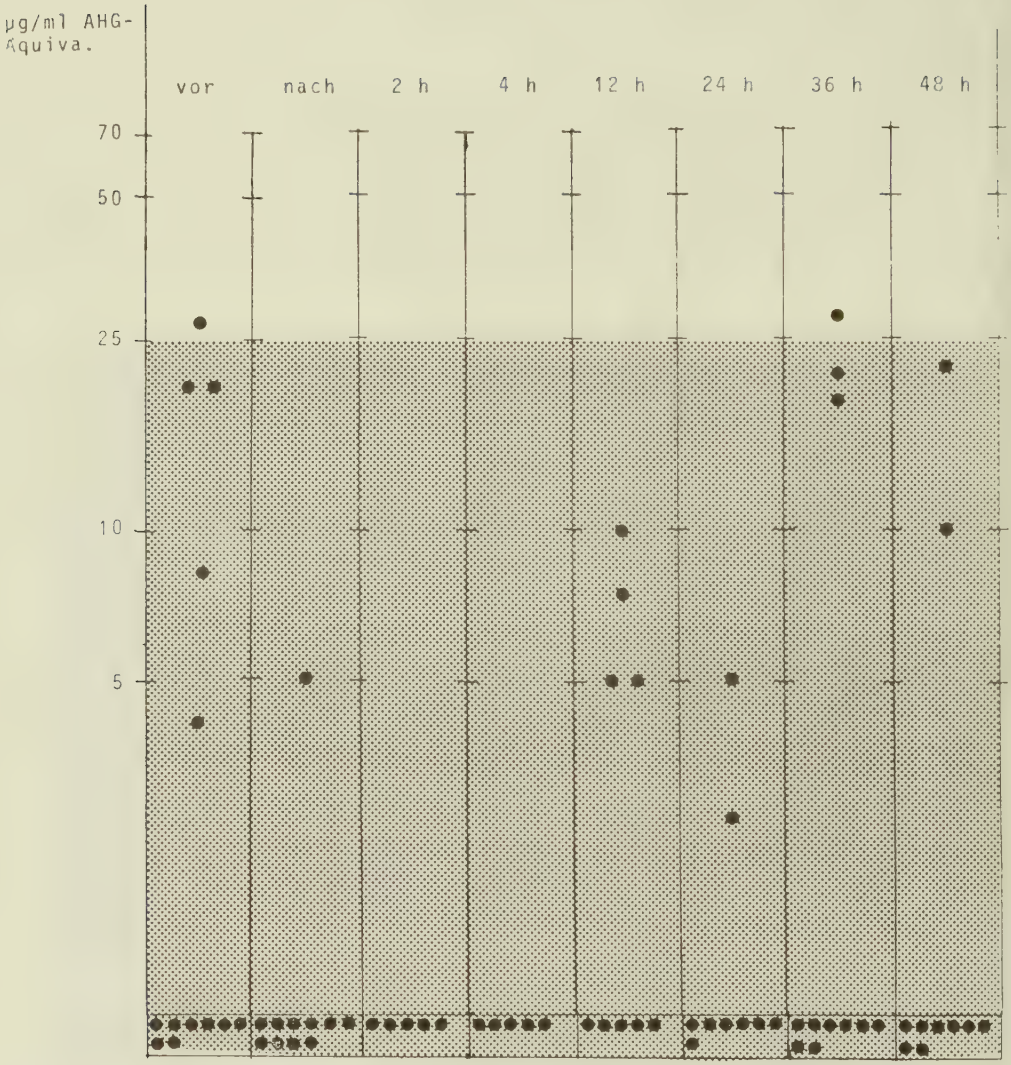



Abb. 17b C3b-bindende IgG-Immunkomplexe vor und nach der zweiten l-Asp-Gabe bei 14 Kindern mit ALL. Die Spiegel sind in µg AHG-Äquivalenten/ml Lösung angegeben. Die Mediane sind durch Querbalken gekennzeichnet, der Kontrollbereich gesunder Erwachsener ist schraffiert. Die negativen Nachweise sind im Kasten unter der Abbildung aufgeführt.

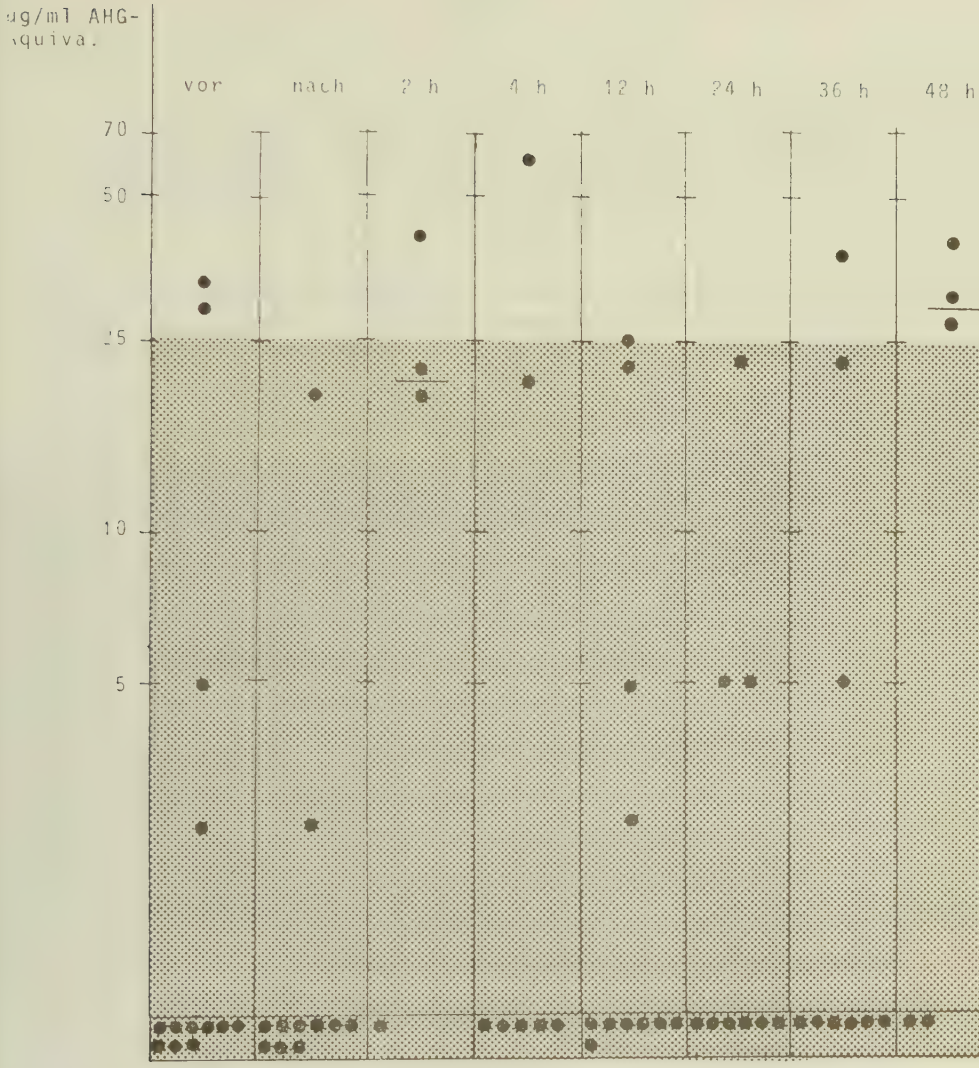



Abb. 17c C3b-bindende IgG-Immunkomplexe vor und nach der dritten l-Asp-Gabe bei 14 Kindern mit ALL. Die Siegel sind in µg AHG-Äquivalenten/ml Lösung angegeben. Die Mediane sind durch Querbalken gekennzeichnet, der Kontrollbereich gesunde Probanden ist schraffiert. Die negativen Nachweise sind im Kasten unter der Abbildung aufgeführt.

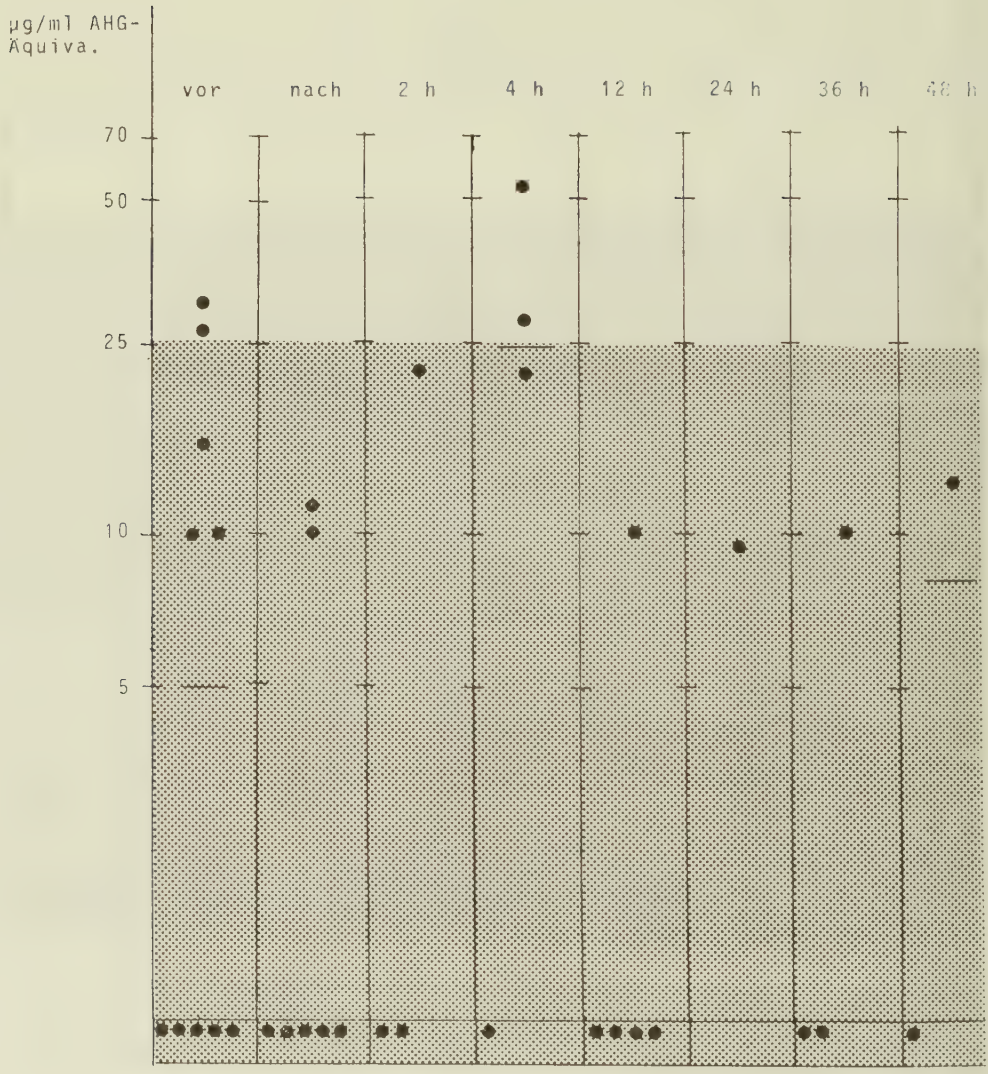



Abb. 17d C3b-bindende IgG-Immunkomplexe vor und nach der vierten l-Asp-Gabe bei 14 Kindern mit ALL. Die Spiegel sind in µg AHG-Äquivalenten/ml Lösung angegeben. Die Mediane sind durch Querbalken gekennzeichnet, der Kontrollbereich gesunde Probanden ist schraffiert. Die negativen Nachweise sind im Kasten unter der Abbildung aufgeführt.

## 3. Beziehung zwischen spezifischen IgG-Anti-l-Asp-Antikörpern, l-Asp-enthaltenden Immunkomplexen und der Eliminationsgeschwindigkeit von l-Asp in vitro und in vivo

Durch die Bildung spezifischer Immunkomplexe kann in vivo prinzipiell die Pharmakokinetik eines Antigens verändert werden, wie dieses speziell für die l-Asp von Wahn et al. (1983) in vivo und von Petersen et al. (1976) in vitro schon vermutet worden ist. Im folgenden soll zunächst durch in vitro Experimente abgeklärt werden, in wieweit l-Asp durch Immunkomplexbildung inaktiviert werden kann. Anschließend soll die Antikörperentwicklung in vivo im Zusammenhang mit der l-Asp-Elimination betrachtet werden.

Bei der Herstellung von Immunkomplexen aus l-Asp und Anti-l-Asp-IgG wie es im Methodenteil schon ausführlich dargelegt worden ist, kann bei verschiedenen Antigen-Antikörper-Relationen eine unterschiedliche Inaktivierung der l-Asp beobachtet werden (Abb. 18) Im Experiment A ist besonders wichtig, daß es praktisch nicht zu einer Präzipitatbildung kommt, d.h. bei diesem Verhältnis von Antigen zu Antikörper werden fast ausschließlich lösliche Immunkomplexe gebildet. Trotzdem ist schon eine erhebliche Inaktivierung der l-Asp zu erkennen. Ein weiterer wesentlicher Befund ist die Tatsache, daß in diesem wie auch in den folgenden Experimenten die Verminderung des Antigens durch Immunkomplexbildung wesentlich stärker zu sein scheint als die der funktionellen Aktivität. Bei weiterer Antikörperzugabe nimmt der Proteingehalt des unlöslichen Präzipitates zu, gleichzeitig wird aber auch die Inaktivierung der l-Asp im Überstand deutlicher (Abb. 17). Zusammenfassend läßt sich damit sagen, daß l-Asp durch Immunkomplexbildung inaktiviert werden kann, unter bestimmten Bedingungen aber lösliche Immunkomplexe mit enzymatischer Aktivität vorliegen.

Die Unterschungen des Zusammenhanges zwischen Antikörperspiegel und l-Asp-Elimination in vivo zeigen eine gewisse Korrelation mit den in vitro Ergebnissen . Auch hier kommt es in Abhängigkeit vom Antikörperspiegel prä infusionem zu einer deutlichen, allerdings

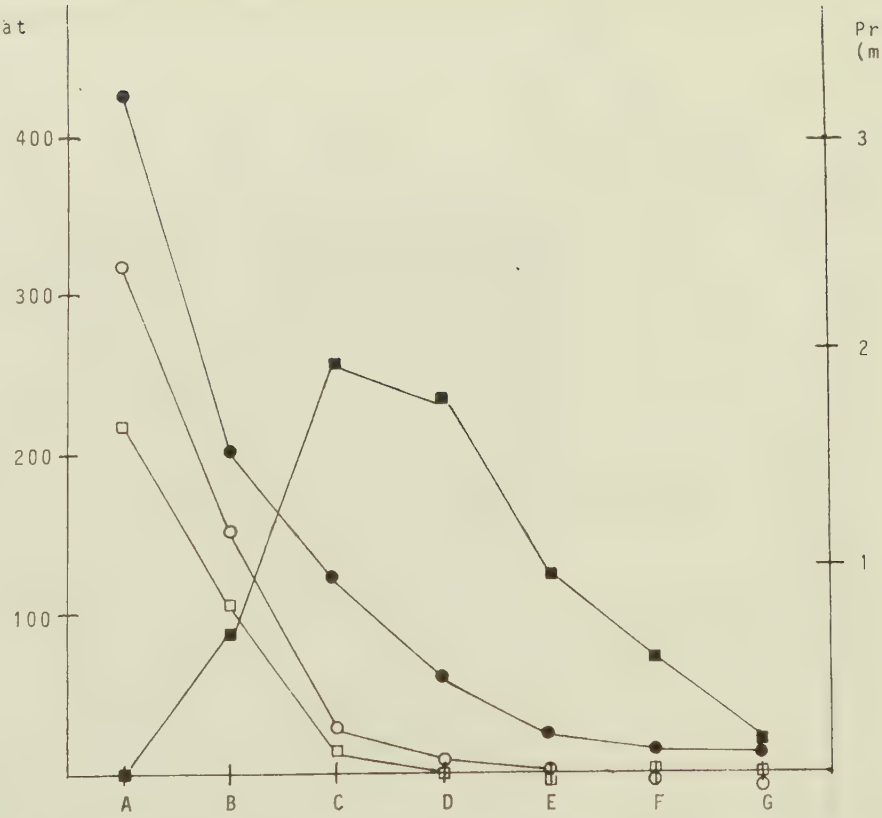



Abb. 18 Darstellung gemessener l-Asp-Aktivität (○) und Antigenkonzentration (□) im Überstand von Mischungen verschiedener l-Asp-Anti-l-Asp-Relationen, die zur Bildung löslicher Immunkomplexe 30 Minuten bei 37°C inkubiert werden. Unlösliche Komplexe werden durch anschließende Zentrifugation entfernt. Der hierdurch entstehende Proteinverlust (■) ist ebenfalls abgebildet. Darüberhinaus ist die jeweils eingetzte l-Asp-Menge (■) dargestellt.

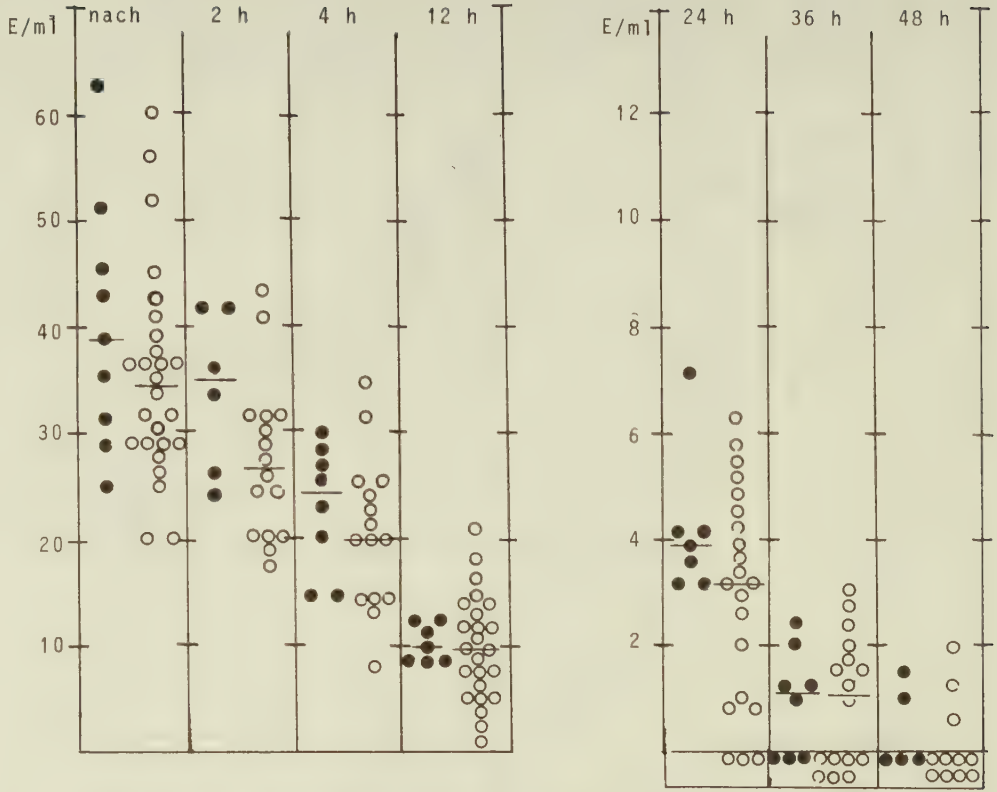



Abb. 19b l-Asparaginase-Antigenbestimmung in Abhängigkeit des AntikörperSpiegel vor den Infusionen. Verglichen wurden die Konzentrationen vor, unmittelbar nach, 2, 4, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach den l-Asparaginase-Gaben für normale IgG-Spiegel ( ) und erhöhte ( ). Die Mediane sind durch Querbalken hervorgehoben, die Konzentrationen sind in E/ml angegeben. Die Unterschiede sind nicht signifikant (Mann-Whitney-Wilcoxon-Test).

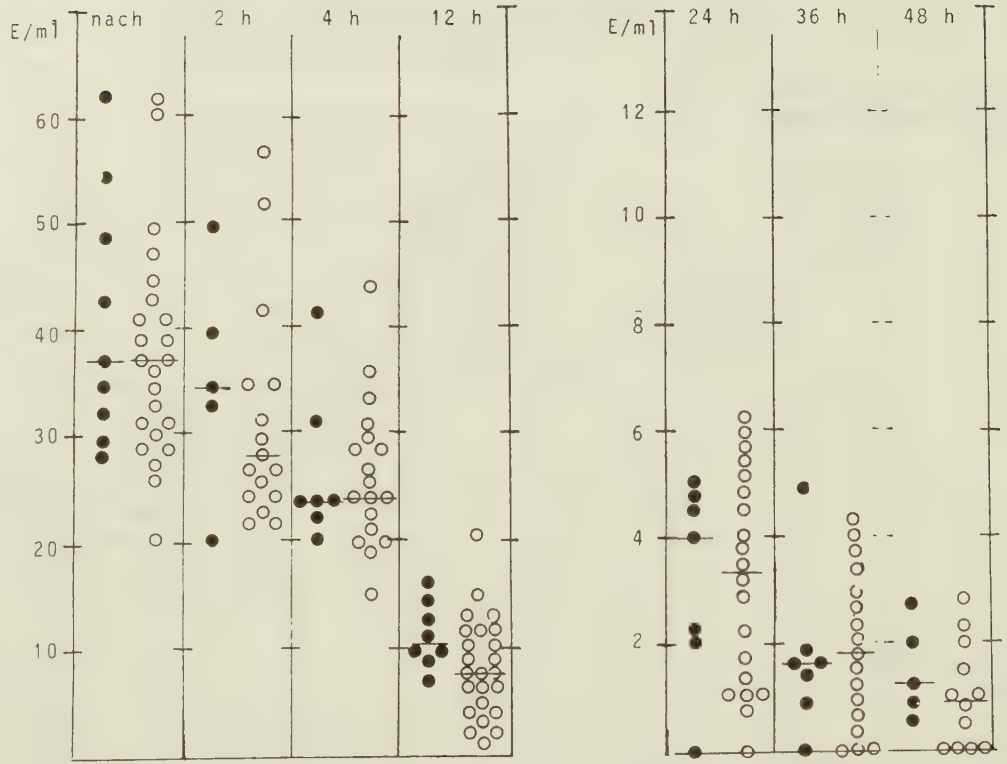



Abb. 19a l-Asparaginase-Aktivitätsbestimmung in Abhängigkeit der Anti-l-Asparaginase-IgG-Spiegel vor den l-Asparaginase-Infusionen. Verglichen wurden die Aktivitäten vor, unmittelbar nach, 2, 4, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach den Infusionen für erhöhte ( ) bzw. normale ( ) Antikörperspiegel. Die Mediane sind durch Querbalken hervorgehoben. Die Konzentrationen sind in E/ml angegeben. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-Wilcoxon-Test).

statistisch nicht signifikant verzögerten l-Asp-Aktivitäts-Elimination. Nach ca. 12 Stunden ist kein auffälliger Unterschied mehr festzustellen. Überraschenderweise kommt es zunächst auch zu einer verzögerten Elimination des Antigens, die aber von einer beschleunigten Elimination gefolgt wird, sodaß nach 4 Stunden kein Unterschied zwischen den Patienten mit bzw. ohne erhöhte Antikörperspiegel vor den Infusionen nachzuweisen ist (Abb. 19 a und b).

Am Rande erwähnt seien auch die Ergebnisse, die man erhält, wenn man die Elimination der l-Asp in Abhängigkeit vom Spiegel spezifischer IgG Immunkomplexe untersucht. Bei positivem Immunkomplexnachweis kommt es zu einer leichten Verzögerung der Elimination der l-Asp-Aktivität, während die Halbwertszeit für das Antigen deutlich verkürzt ist.

4. Möglicher Zusammenhang zwischen Anti-l-Asp-IgG-Antikörperspiegeln und Remissionszeiten der Patienten

Killander et al. (1976) beobachteten bei ihren Patienten, die bivalente Antikörper gegen l-Asp gebildet hatten, vermehrt Remissionen. Nachdem ich in den letzten Kapiteln zeigen konnte, daß die von mir untersuchten Patienten neben einer deutlichen Bildung von IgG Antikörpern gegen l-Asp diese Antikörper auch mit einer verlängerten Wirksamkeit der l-Asp gekoppelt sind, liegt es nun nahe, die von Killander gemachte Beobachtung an meinen Patienten nachzuvollziehen. Die Daten der Patienten im einzelnen für den Stand (11/85) sind in Tab. 5 dargestellt. Es lassen sich drei Beobachtungen festhalten:

1. Diejenigen Patienten, bei denen keine Antikörperbildung nachgewiesen werden konnte, haben in 80% ein Rezidiv erlitten.

2. Demgegenüber ist der Median der Antikörperspiegel bei den Patienten mit Rezidiv wesentlich höher als bei denen, die noch in Remission sind.

3. Die höchsten Antikörperspiegel werden bei den Patienten mit Rezidiv gefunden.

Allerdings müssen diese Ergebnisse in sofern relativiert werden, als daß der Patient B.B., der die höchsten Antikörperspiegel aufweist, sich in einer jetzt drei Jahre andauernden Zweitremission befindet.

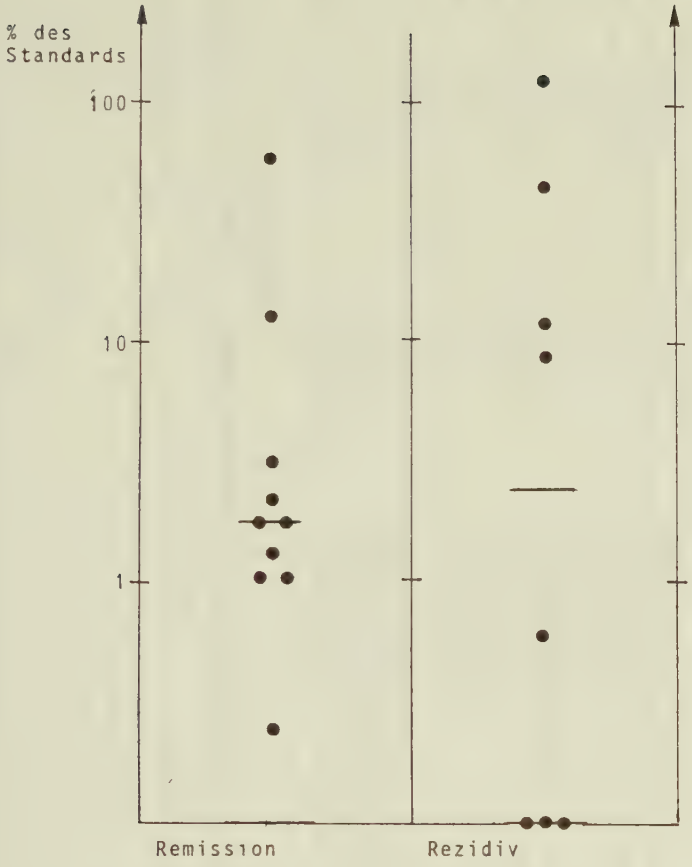



Abb. 20 Beziehung zwischen Anti-l-Asparaginase spezifischen IgG-Antikörpern vor der letzten l-Asparaginase-Gabe und dem klinischen Verlauf bei 22 Kindern, die an einer ALL erkrankt waren. Es zeigt sich ein Trend, daß erhöhte Antikörpertiter mit einem schlechteren Therapieerfolg einhergehen. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant (Mann-Wilcoxon-Whitney-Test).

Tab. 5, Seite 1

| Initialen | Anti-l-Asp-IgG % d. Standards | Therapiebeginn | klinischer Zustand der Patienten |
|---|---|---|---|
| K., Th. | 0,2 | 8/83 | in Remission |
| K., A. | 0,0 | 9/83 | ZNS Rez.9/84, KM Rez. 3/85 |
| G., G. | 0,0 | 4/83 | KM Rez.9/83 |
| S., B. | 1,0 | 8/82 | in Remission |
| D., D. | 1,1 | 10/82 | in Remission |
| T., M. | 1,4 | 4/83 | in Remission |
| S., J | 1,4 | 9/82 | in Remission |
| B., T. | 2,1 | 7/83 | in Remission |
| D., V. | 3,0 | 3/82 | in Remission |
| St., G. | 15,0 | 5/82 | in Remission |
| K., H. | 0,0 | 3/83 | KM Rez. 11/84 |
| B., S. | 0,8 | 12/82 | KM Rez. 11/85 |
| B., M. | 14,0 | 7/82 | ZNS Rez. 9/83,Hoden Rez. 1/85 |
| R., M. | 45,0 | 8/82 | Km Rez. 10/85 |

| Initialen | Anti-l-Asp-IgG % d. Standards | Therapiebeginn | klinischer Zustand der Patienten |
|---|---|---|---|
| S., A. | 47,0 | 10/82 | in Remission, allerg. Reaktion |
| K., R. | 1,0 | 1/82 | in Remission, allerg. Reaktion |
| G., G. | 9,5 | 1/82 | KM Rez. 10/83 u. 3/84, verstorben 4/84, allergische Reaktion |
| A., J. | 14,0 | 1/82 | in Remission, allerg. Reaktion 1. Reind. |
| B., T. | 40,0 | 2/82 | ZNS Rez. 9/84, allerg. Reaktion 1. Reind. |
| Z., A. | 100,0 | 1/82 | KM Rez. 5/84, verstorben 12/84, allerg. Reaktion 1. Reind. |
| B., S. | 100,0 | 5/82 | 1. Rez in Remission, allerg. 4. Ind. |
| N., M. | 11,0 | 1/82 | an Therapiekomplikation verstorben in der Induktion |

Tab. 5 Korrelation zwischen Anti-l-Asparaginase-IgG-Spiegeln bei 22 ALL Kindern vor der letzten l-Asparaginase-Infusion und den klinischen Verläufen.

## 5. Allergische Reaktionen auf l-Asparaginase - Risikoabschätzung und Möglichkeiten zur Verhütung:

Eine wesentliche Nebenwirkung der Behandlung mit l-Asp stellen allergische Reaktionen dar. In der Vergangenheit wurden bei diesen Patienten erhöhte spezifische Antikörperspiegel gefunden. Eine Risikoabschätzung für einen großen Teil der Patienten gelang Fabry et al. (1985), allerdings untersuchten sie nur IgG und IgM Antikörper. Meine Ergebnisse die Immunglobulinklassen G, M, E betreffend sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6 Anti-l-Asp-IgG,-IgM -und IgE-Spiegel bei 8 Kindern mit ALL im Verlaufe von 4 l-Asp-Gaben. Die Spiegel werden soweit möglich vor und nach den Infusionen ermittelt. Die Konzentrationen sind in % des Standards angegeben.

| Initialen | Antikörper gegen l-Asparaginase | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | IgG | | IgM | | IgE | |
| | vor | nach | vor | nach | vor | nach |
| B., B. | 100% | 100% | 23,0% | 25,0% | 120% | 80% |
| Z., A. | 100% | 100% | 0,0% | 0,0% | | 0,1% |
| S., A. | 47,0% | 27,0% | 17,0% | 13,0% | | |
| A., J. | 15,0% | 3,5% | 0,2% | 0,0% | 0,1% | |
| N., M. | 11,0% | 2,7% | 22,0% | 10,0% | 0,0% | |
| G., G. | 12,0% | 7,0% | 20,0% | 16,0% | | 6,0% |
| K., R. | 1,0% | 0,4% | 5,5% | 1,8% | 0,1% | |
| B.,T. | 40,0% | 15,0% | 0,0% | 0,0% | 3,0% | 0,6% |

Betrachtet man die Ergebnisse der Antikörpertiter vor den Infusionen so ergibt sich folgendes Bild (Tab. 7):

Insgesamt konnten alle drei Isotypen bei 5 der 8 Patienten vollständig untersucht werden. Ein Patient hatte erhöhte Spiegel

aller drei Immunglobulinklassen. In einem Fall waren nur IgG und IgM bzw. IgE erhöht, der vierte Patient wies nur erhöhte IgG und der fünfte nur IgM Spiegel auf. Somit scheinen die IgG Antikörper die wesentlichste Rolle bei der Entwicklung allergischer Reaktionen auf l-Asparaginase zu spielen, während die IgE Antikörper im Serum nur eine geringe Assoziation mit klinischen Symptomen aufweisen. Erhöhte IgG Antikörpertiter sind mit einem signifikant erhöhten Risiko für eine allergische Reaktion verbunden (Abb. 21).

Tab. 7 Prädiktive Bedeutung von Antikörpermessungen in Bezug auf allergische Reaktionen auf l-Asp bei 5 Kindern mit klinischen Symptomen, bei denen alle drei Antikörperklassen vor den Infusionen, unter denen die allergischen Reaktionen auftreten, gemessen werden können. Die Pfeile geben an, ob die Antikörpertiter normal (N), leicht ( ), oder deutlich ( ) erhöht sind.

| Initialen | IgG | IgM | IgE | Reaktion erkärbar durch |
|---|---|---|---|---|
| B., B | ↑↑ | ↑ | ↑↑ | IgG, IgM, IgE |
| A., J | ↑ | N | N | IgG |
| N., M. | ↑ | ↑ | N | IgG, IgM |
| K., R. | N | ↑ | N | IgM |
| B., T. | ↑↑ | N | ↑ | IgG, IgE |

Patienten mit erhöhten IgG Antikörpern (7/8) zeigten unter den Infusionen in der Regel eine deutliche Reduktion der Spiegel. Fabry et al. (1985) beobachteten bei 6 von den 7 Kindern eine Aktivierung des klassischen Komplementweges in Gegenwart erhöhter IgG Antikörper, wie er typischerweise durch Immunkomplexe erzeugt wird. Aus diesem Grund sind die Patienten auf ihren Gehalt an Immunkomplexen - spezifischen und unspezifischen - untersucht

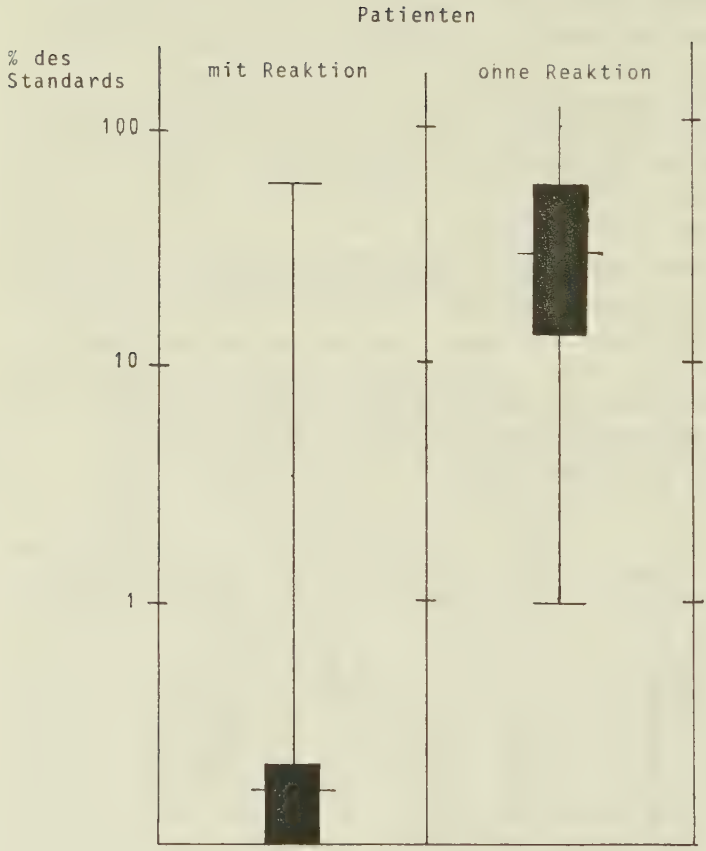



Abb. 21 Anti-l-Asparaginase-IgG-Spiegel vor l-Asparaginase-Applikation bei 22 Patienten, die a) eine und b) keine allergische Reaktion auf das Medikament erlitten. Die Mediane sind durch Querbalken gekennzeichnet, die dunklen Felder entsprechen 50% der gemessenen Werte, der Streubereich ist durch senkrechte Striche mit abschließenden Querbalken markiert. Patienten mit allergischen Reaktionen hatten signifikant höhere Antikörperspiegel als die Patienten ohne ($P < 0,01$, Mann Whitney Wilcoxon Test).

worden. Es findet sich in allen drei Immunkomplextests (die Ergebnisse des antigenspezifischen ELISA sind hier nur erwähnt, nicht aber ausführlich dargestellt, da sich dieser Test als sehr wenig reproduzierbar erwies) für die untersuchten 6 Kinder mit Aktivierung des klassischen Komplementweges keine eindeutige Zu-oder Abnahme der Spiegel im Verlaufe der allergischen Reaktionen. Bei einigen Patienten lassen sich weder vor noch nach den Reaktionen Immunkomplexe bestimmen. Somit können die Immunkomplexmessungen weder zur Risikoabschätzung noch zur Erklärung der gefundenen Komplementaktivierung beitragen.

Tab. 8 C3b-bindende und PEG fällbar IgG Immunkomplexe bei 6 Kindern, di erhöhte Anti-l-Asparaginase IgG Titer haben und die auf die Gabe des Medikamentes eine anaphylaktische Reaktion erlitten. Die Spiegel wurden vor und nach den Reaktionen gemessen. k.S. bedeutet: kein Serum vorhanden.

| Initialen | C3b-bindende Immunkomplexe µg AHG-Äquiv./ml | | PEG-präzipitable Immunkomplexe mg/dl | |
|---|---|---|---|---|
| B., B | 270 | 50 | 0 | 0 |
| N., M. | 440 | 40 | 0 | 2,1 |
| Z., A. | 1600 | 1600 | 0 | 0 |
| G., G. | k.S. | 2 | k.S. | 2,8 |
| A., J. | 14 | 40 | 0 | 0 |
| S., A. | 0 | 50 | 0 | 0 |

Bei Patienten, die allergisch auf l-Asp reagiert haben, steht man vor dem Problem, entweder die Behandlung mit l-Asp abzubrechen und damit ein therapeutisches Loch in Kauf zu nehmen, oder aber eine andere l-Asp-Präparation einzusetzen, wie z.B. Erwinia Aspara-

ginase. Hierbei entstehen Probleme hinsichtlich der Toxizität. Außerdem ist eine gewisse Kreuzreaktivität nicht auszuschließen. In neuerer Zeit wird eine weitere Alternative durch PEG modifizierte l-Asp angegeben (Abuchowski et al., 1984). Im folgenden wurden Crasnitin, Leunase, Erwinia Asp und PEG modifizierte Asp durch HPLC Elution auf ihre Proteinbestandteile hin und die bestehende Kreuzreaktivität untersucht. Hierbei findet sich ein weitgehend identisches Verteilungsmuster für die drei erstgenannten Präparationen. Der größte Proteinanteil hat ein Molekulargewicht von ca. 120 KD, ein weit kleinerer Anteil liegt bei ca. 200 KD. Der kleinste Proteinteil hat ein MWG von nahezu 400 KD. Die größte spezifische Aktivität findet sich im Bereich von 200 KD, die geringste spezifische Aktivität korreliert mit dem höchsten MWG. Von diesen drei Präparationen unterscheidet sich die PEG modifizierte l-Asp sehr erheblich. Ca. 95% der Proteinmenge finden sich in einem Molekulargewichtsbereich von 220KD.

Die spezifische Aktivität liegt mit ca. 120 E/mg Protein etwas niedriger als für Leunase (ca. 135 E/mg) bzw. Crasnitin ( ca. 140 E/mg). Für Erwinia Asparaginase beträgt sie ca. 270 E/mg.

Tab. 9 Verteilung der Proteinanteile für Crasnitin, Erwinia Asp Leunase und PEG modifizierter l-Asparaginase Angegeben ist das Molekulargewicht, die spezifische Aktivität und der Proteinanteil für die einzelnen Enzymbestandteile.
n. d. bedeutet: nicht zu definieren, da unter der Nachweisgrenze.

| Präparat | Molekularagewicht | spezif. Aktivität | Proteinanteil |
|---|---|---|---|
| Crasnitin | 400 KD | 111 E/mg | 2,8% |
| | 250 KD | 148 E/mg | 7,8% |
| | 120 KD | 133 E/mg | 89,4% |
| Leunase | 400 KD | 131 E/mg | 4,6% |
| | 250 KD | 150 E/mg | 10,0% |
| | 120 KD | 128 E/mg | 85,4% |
| Erwinia | 400 KD | 251 E/mg | 3,0% |
| | 250 KD | 308 E/mg | 9,1% |
| | 120 KD | 265 E/mg | 87,9% |
| PEG-Asp | 220 KD | 120 E/mg | ca. 95% |
| | 60 KD | n. d. | n. d. |

Eine Untersuchung der Kreuzreaktivitä mit verschiedenen Patientenseren im ELISA zur Messung der spezifischen Antikörper ergibt, nachdem überprüft worden ist, daß alle vier l-Asp-Präparationen in etwa gleichem Ausmaß an die Mikrotiterplatte absorbiert werden, daß PEG modifizierte l-Asp von den Antikörpern gegen Crasnitin praktisch nicht erkannt wird, während dieses für Erwinia Asp in einem geringen Ausmaße der Fall ist. Leunase wird in fast ähnlicher Größenordnung von den Antikörpern erkannt, wie Crasnitin (Tab. 10 und Abb. 22 a-d).

Tab. 10 Extinktionen im ELISA bei der Messung von gegen l-Asp gerichteten IgG-Antikörper aus einigen Patientenseren unter Verwendung von Leunase, Crasnitin, Erwinia-Asp und PEG-modifizierter-Asp als an die solide Phase gebundenes Antigen. Der Normalbereich wurde durch die Messung von 20 Seren gesunder Probanden erstellt. Die Messungen sind alle an einem Tag und unter den gleichen äußeren Bedingungen durchgeführt worden.

| Patient | Crasnitin | Leunase | Erwinia Asp | PEG-Asp |
|---|---|---|---|---|
| M.R. | 1,07 | 0,67 | 0,07 | 0,02 |
| T.B. | 0,9 | 0,57 | 0,17 | 0,03 |
| A.Z. | 1,27 | 0,98 | 0,18 | 0,14 |
| Normal-Bereich | 0,06-0,28 | 0,05-0,27 | 0,03-0,15 | 0,02-0,07 |

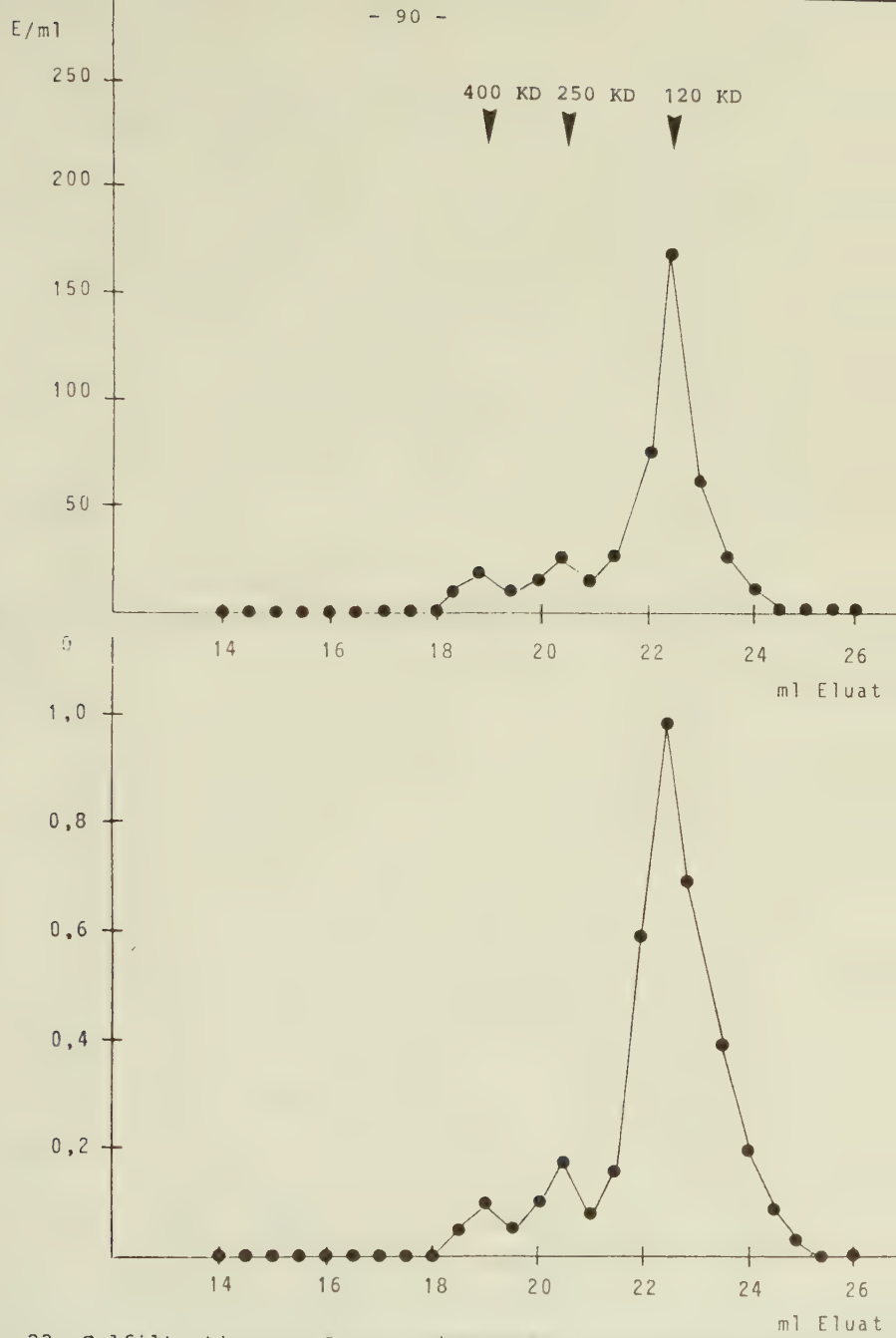



Abb. 22a Gelfiltration von Leunase (HPLC-Säule, Ultro Pac TSK SW 4000, LKB). Die Elution erfolgte mit 0,5 ml/Minute, gesammelt wurde 0,5 ml Fraktionen. Abgebildet sind die Ergebnisse der l-Asp-Aktivitätsbestimmung in den Fraktionen (oben) und die Messung des Proteingehaltes bei 280 nm. Die Molekulargewichte sind unserem Kalibrierungsdiagramm für diese Säule entnommen.

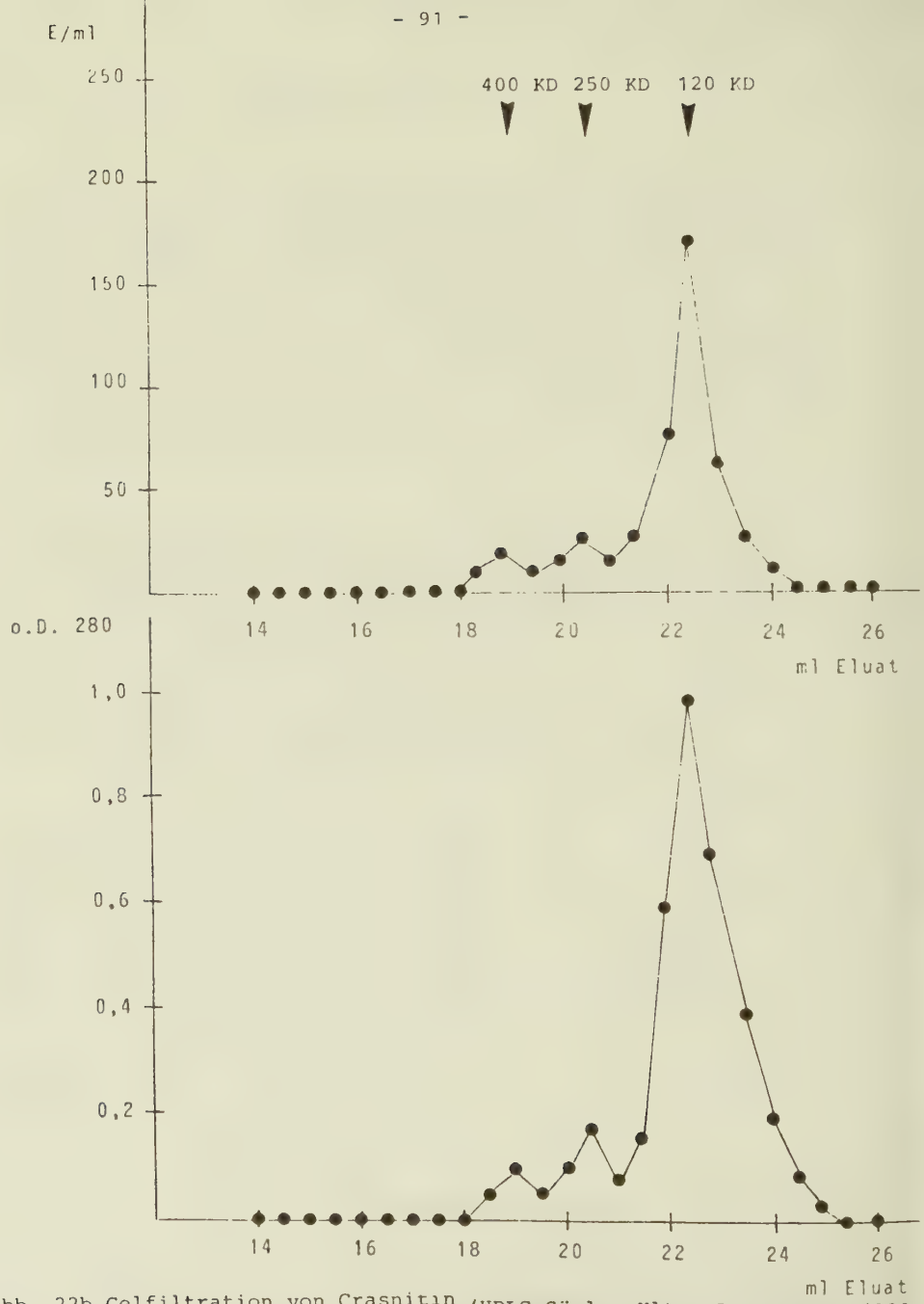



Abb. 22b Gelfiltration von Crasnitin (HPLC-Säule, Ultro Pac TSK SW 4000, LKB). Die Elution erfolgte mit 0,5 ml/Minute, gesammelt wurde 0,5 ml Fraktionen. Abgebildet sind die Ergebnisse der l-Asp-Aktivitätsbestimmung in den Fraktionen (oben) und die Messung des Proteingehaltes bei 280 nm. Die Molekulargewichte entstam unserem Kalibrierungsdiagramm für diese Säule.

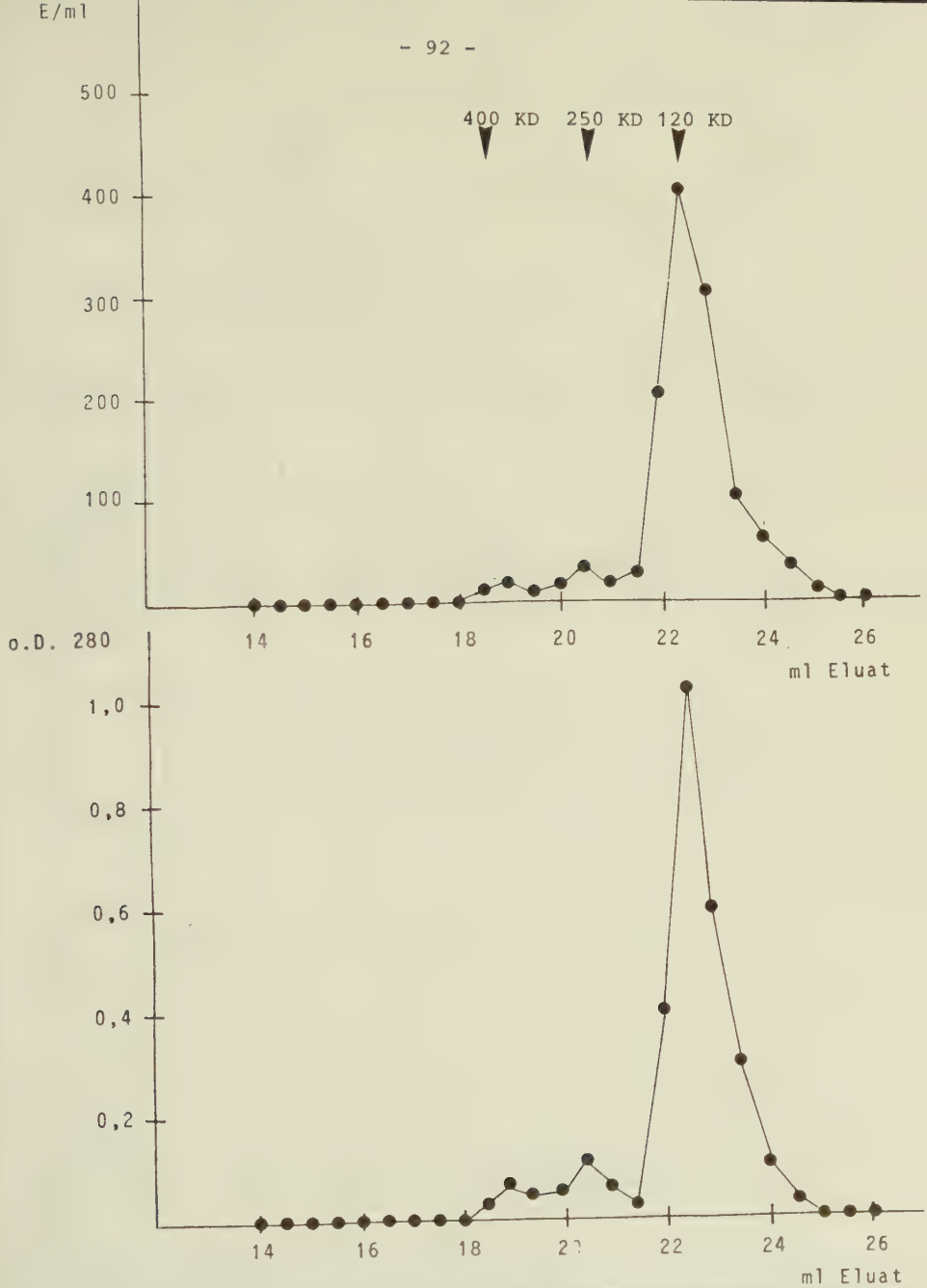



Abb. 22c Gelfiltration von Erwinia Asparaginase (HPLC-Säule, Ultro Pac, TSK SW 4000, LKB). Die Elution erfolgte mit 0,5 ml/Minute, gesammelt wurden 0,5 ml-Fraktionen. Dargestellt sind die Ergebnisse der l-Asp-Aktivitätsbestimmung (oben) und die Messung des Proteingehaltes bei 280 nm. Die Molekulargewichtsmarkierungen sind dem Kalibrierungsdiagramm für diese Säule entnommen.

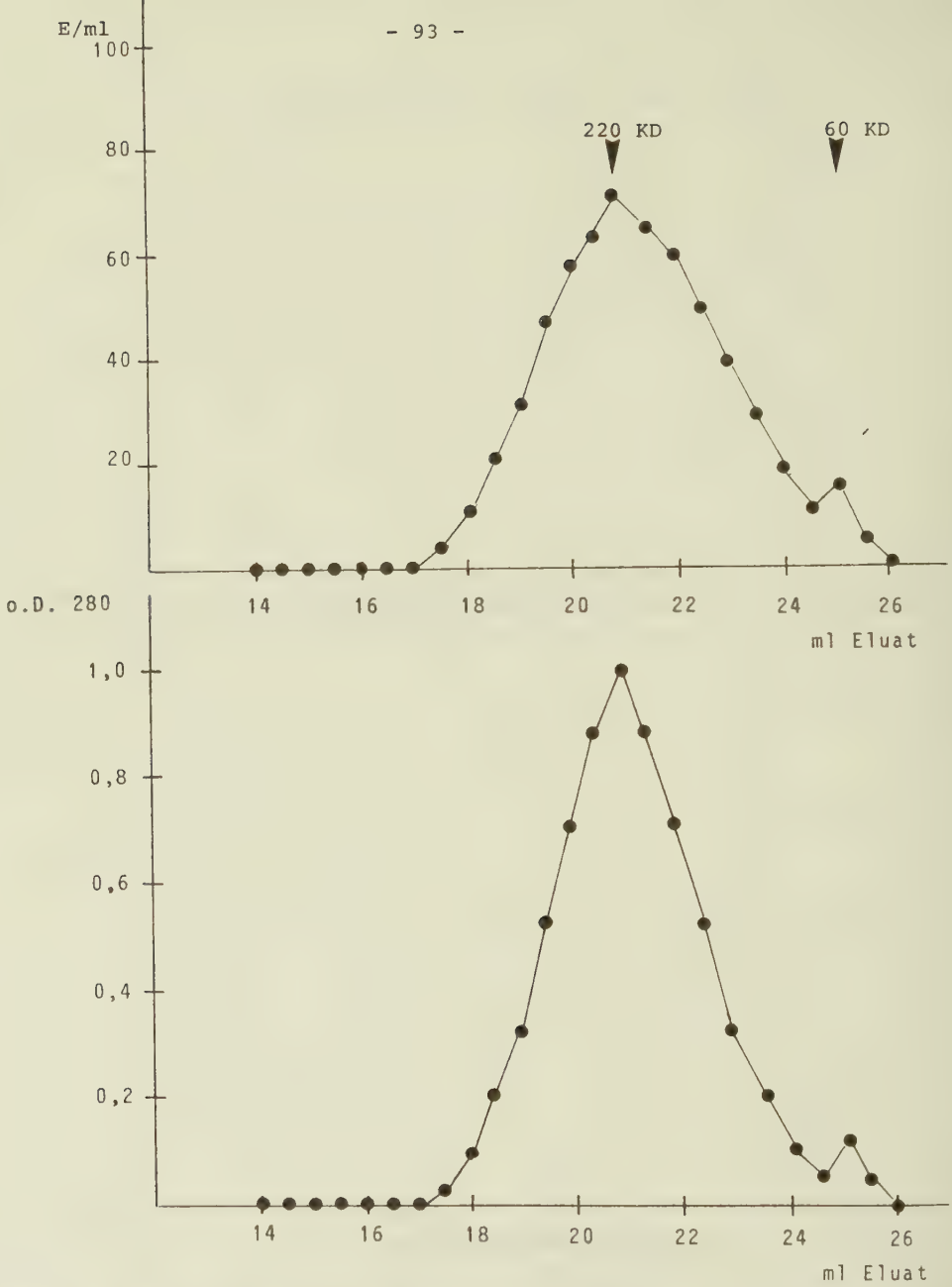



Abb. 22d Gelfiltration von PEG modifizierter l-Asparaginase (HPLC, Ultro Pac, TSK SW 4000, LKB). Eluiert wurde mit 0,5 ml/Minute, wobei pro Minute auch eine Fraktion gesammelt wurde. Dargestellt sind die Bestimmung der l-Asp-Aktivität (oben) und des Proteingehaltes bei 280 nm. Die Molekulargewichtsmarkierungen entstammen dem Kalibrierungsdiagramm für diese Säule.

Diskussion:

## 1. L-Asp in der heutigen Tumortherapie

L-Asparaginase ist heutzutage ein unverzichtbarer Bestandteil der meisten Chemotherapieprotokolle zur Behandlung der ALL im Kindes- und Erwachsenenalter.

Die Wirksamkeit dieses Enzyms wurde zuerst von Broome (1968) aufgedeckt. Er konnte nachweisen, daß das Wachstum einer Reihe maligner Lymphome durch die Verminderung der extrazellulären Konzentration des l-Asparagins bei der Anwesenheit von l- Asp in der Kultur gehemmt werden kann.

Die Wirksamkeit von l-Asp in vivo wurde von Öttgen et al. (1970) bestätigt. Einige Autoren vertraten die Ansicht, daß durch l-Asparaginase Remissionen eingeleitet werden können (Wehinger et al., 1981), während andere meinten, daß durch dieses Medikament nur die Remissionszeiten verlängert werden (Holland et al., 1981).

Im Gegensatz zu den meisten anderen in der Therapie eingesetzten Chemotherapeutika, ist die Wirkung der l-Asp nicht mit einer Knochenmarksdepression verbunden, sodaß dieses Medikament weitgehend unbedenklich in Kombination mit anderen Zytostatika eingesetzt werden kann. Der Einsatz der l-Asparaginase ist weniger durch toxische Nebenwirkungen limitiert als durch die immunogenen Eigenschaften, wodurch es zu Antikörperbildung mit nachfolgend allergischen Reaktionen kommen kann, wie es kürzlich von Fabry et al. (1985) überzeugend dargelegt werden konnte. Die Konsequenz aus solchen Ereignissen ist entweder ein Therapieabbruch oder ein Wechsel des Präparates. Darüberhinaus besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß durch eine Sensibilisierung der Patienten die Pharmakokinetik dieses Medikamentes verändert wird (Wahn et al., 1983).

## 2. ELISA-Test zum Nachweis 1-Asp spezifischer Immunkomplexe

Durch in vitro Experimente konnte belegen werden, daß mit diesem Test nur Immunkomplexe nicht aber Antikörper oder Antigen allein erfaßt werden. Besonders gut scheint dieser Nachweis im Bereich des Äquivalenzpunktes zu gelingen. Dieses Phänomen könnte dadurch erklärt werden, daß sowohl in Antigen-wie auch in Antikörperüberschuß nur wenige freie Bindungsstellen für die Reaktionspartner im Testansatz zur Verfügung stehen. Problematisch erscheint allerdings die geringe Reproduzierbarkeit (besonders im unteren Bereich) dieses Testes, die wahrscheinlich mit der geringen, absoluten Immunkomplexkonzentration erklärt werden kann, die sicherlich in der Nähe des absoluten Nachweisminimums des Testes liegt. Da der Test nicht den Anforderungen eines klinisch-chemischen genügt, können mit seiner Hilfe nur Trends aufgezeichnet, nicht aber absolute Aussagen gemacht werden.

## 3. PEG präzipitable Immunkomplexe

Die Testbedingungen sind an verschiedener Stelle sehr unterschiedlich beschrieben (Chia et al., 1979, Digeon et al., 1977, Johansen et al., 1980, Riha et al., 1978). Dieses beruht sicherlich zum Teil auf den einzelnen berücksichtigten Faktoren. So fanden Johansen et al. (1980) eine positive Korrelation zwischen der Präzipitierbarkeit der Immunkomplexe und dem Molekulargewicht des verwendeten PEG. Bei niedrigen PEG Konzentrationen sollen nach Ansicht dieser Autoren nur große Immunkomplexe präzipitiert werden, d.h. solche Komplexe, die z.B. in Antikörperüberschuß gebildet werden. Sie vermuteten, daß die Wirkung des PEG auf die Immunkomplexe durch den Entzug von Wasser durch interne Sauerstoffgruppen beruht, wodurch die Viskosität der Komplexe herauf und die Löslichkeit herabgesetzt wird. Die Testbedingungen in dieser Dissertation wurden weitgehend aus der Beschreibung von Chia et al. (1979) übernommen. Im Gegensatz zu dieser Arbeitsgruppe und den meisten anderen beschränkte ich mich nicht darauf, das Präzipitat nur einmal zu waschen, sondern führte drei Wasch-

vorgänge unter der Vorstellung durch, hierdurch den Gehalt des Präzipitates an monomeren Immunglobulinen zu vermindern. Diese Gefahr besteht besonders bei Seren mit hohem Immunglobulingehalt. Das Risiko, bei einem solchen Vorgehen Präzipitatverluste zu bekommen, ist gering, da nach den Befunden von Johansen et al. (1980) ein einmal gebildetes Präzipitat in Anwesenheit von PEG nicht wieder aufgelöst wird. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß bei nur einem Waschvorgang das Präzipitat durch monomere Immunglobuline verunreinigt werden kann. So fanden Digeon et al. (1977) einen hohen Anteil unspezifisch präzipitierter Immunglobuline bei einer IgG Konzentration im Serum von über 2500 mg/dl. Im Ergebnisteil konnte nachgewiesen werden, daß diese Fehlermöglichkeit durch drei Waschvorgänge weitgehend eliminiert werden kann.

## B. Diskussion der klinischen Daten

### 1. Bildung spezifischer Antikörper gegen l-Asp

Zusätzlich zu der eingehend untersuchten anti-leukämischen Wirkung der l-Asp durch Erniedrigung des extrazellulären l-Asparaginspiegels übt dieses Medikament auch immunsuppressive Wirkungen aus (Lauenstein et al. 1970, Schäffner et al., 1977, Schwartz et al., 1969). Hierbei kommt es sowohl zu einer Beeinflussung der humoralen wie auch der zellulären Abwehr, indem z.B. die Bildung spezifischer Antikörper durch l-Asp dosisabhängig bis zu einem gewissen Grad unterdrückt werden kann (Maral et al., 1970) oder aber in tierexperimentellen Untersuchungen die Abstoßung von Transplantaten durch l-Asp verzögert werden konnte (Lauenstein et al., 1970). Andererseits kann l-Asp auch durch seine Eigenschaften als Fremdprotein immunogen wirken, was zur der Bildung spezifischer Antikörper führen kann (Dellinger et al., 1976, Dohlwitz et al., 1970, Ehlag et al., 1977, Evans et al., 1982, Khan et al., 1969, Killander et al., 1976, Petersen et al.,

1971, Spiegel et al., 1980). Auch bei den hier untersuchten Patienten überwiegt der immunogene Effekt die immunsuppressiven Begleiterscheinungen der l-Asp Behandlung. Im Verlaufe der Induktionsphase der Behandlung, in der vier l-Asp-Gaben verabreicht werden, kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der IgG-Antikörperspiegel gegen l-Asparaginase und auch gelegentlich der IgM-Konzentrationen gegen l-Asparaginase, während spezifische IgE-Antikörper keine wesentlich Rolle spielen. Bei letztgenannten Antikörper scheint eher ein schnelles Auftreten zu überwiegen. So sind bei dem Patienten B. B. erst 24 Stunden vor der letzten l-Asp-Gabe innerhalb von ca. 12 Stunden sehr hohe Spiegel aufgetreten.

Die geschilderten Befunde stehen nur zum Teil im Einklang, mit den in der Literatur schon bekannten. So fanden Killander et al. (1976) ebenfalls die überragende Bedeutung von IgG-Antikörpern, während Petersen et al. (1971) nur bei Patienten mit allergischen Symptomen überhaupt erhöhte Spiegel fand. Die Erklärung für die beschriebenen Unterschiede kann an zwei Punkten ansetzen. Zum einen ist denkbar, daß die unterschiedliche Antikörperbildung durch unterschiedliche Dosierungen hervorgerufen sein kann. So erhielten die Patienten von Petersen et al. (1971) nur eine relativ niedrige l-Asp-Dosis von 20 mal 200E/Kg in täglicher Applikation oder 3 x 1400E/kg pro Woche. Unsere Patienten bekommen eine sehr hohe Dosis von 3000 E/kg im Abstand von 3 Tagen. Die höhere Dosierung der l-Asp basiert auf den Erkenntnissen von Maral et al. (1970), die herausfanden, daß durch höhere Dosen zunächst eine Hemmung der Antikörperbildung durch immunsuppressive Wirkungen eintritt, die Spiegel nach Bildung von Antikörper aber in der Regel höher liegen als bei einer niedrig dosierten Behandlung. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich dadurch, daß die Empfindlichkeit der eingesetzten Testsysteme unterschiedlich ist, daß mit dem hier vorgestellten ELISA wesentlich mehr Antikörper erfaßt werden können. Belegt werden kann die letzte Vermutung durch die Beobachtung, daß in dem Patientenserum, das als Standard benutzt wurde und folglich im ELISA einen Spiegel von 100% erreichte, in der indirekten Hämagglutination nur einen Titer von 1:160 aufwies.

Wie schon ausführlich berichtet, gehören die meisten Antikörper zur IgG Klasse, einige auch zum IgM Typ. Bei den IgE Antikörpern werden die wenigsten positiven Nachweise geführt. Die Bewertung der Bedeutung der einzelnen Immunglobulinklassen ist ohne die Berücksichtigung der allergischen Reaktionen an dieser Stelle nicht durchzuführen. Es erscheint daher sinnvoll, diese Bedeutung erst in dem entsprechenden Kapitel zu diskutieren.

Über die möglichen Folgen einer solchen Antikörperbildung, die nicht im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen stehen, liegen unterschiedliche Ausführungen vor. So fanden Killander et al. (1976) und Petersen et al. (1971) in Anwesenheit dieser Antikörper eine beschleunigte Elimination der l-Asp. Im Gegensatz dazu sprechen Wahn et al. (1983) über eine Verlängerung der HWZ der Enzymaktivität in Gegenwart der Antikörper. Diese Befunde scheinen durch die Beobachtung von Killander et al. (1976) bestätigt zu werden, die bei den Patienten mit Antikörperbildung höhere Remissionsfrquenzen fanden. Eine denkbare Erklärung dieser Phänomene könnte die Bildung spezifischer Immunkomplexe liefern, die zu einer verzögerten Eliminationsgeschwindigkeit führen können und durch die gleichzeitig ein Teil der Enzymaktivität schneller ins Gewebe und damit vielleicht auch an die Zielzellen gelangen könnte.

Da, wie oben schon erwähnt, in meiner Untersuchung IgG Antikörper die wichtigste Rolle spielen, sollen die weiteren Untersuchungen nur für diese Immunglobulinklasse durchgeführt werden.

## 2. Bildung von Immunkomplexen unter l-Asp-Behandlung

Nach der Theorie von Theofilopoulos et al. (1980) werden Immunkomplexe aus Antigen und dem entsprechenden Antikörper gebildet (Theofilopoulos et al., 1980), wobei durch die Bindung an Fc-Rezeptoren bzw. die Aktivierung von Komplement die Elimination der Antigene beschleunigt werden kann. Allerdings ist es prinzipiell auch denkbar, daß kleine Antigene durch die Bildung von Immunkom-

plexen entweder länger in der Zirkulation verweilen oder aber durch Präzipitatbildung im RES abgelagert werden können. Auf diese Möglichkeit soll im folgenden Kapitel eingegangen werden.

Durch die Bindung von spezifischen Antigenen, wie z.B. l-Asp an die entsprechenden Antikörper, die schon mehrfach nachgewiesen werden konnten, wäre eine Bildung von spezifischen Immunkomplexen bei den mit diesem Medikament behandelten Patienten denkbar. Allerdings war es bisher auf Grund der sehr niedrigen Konzentrationen solcher Komplexe in den Seren der Patienten nicht möglich, diese zu analysieren (Petersen et al., 1971). Dieser Arbeitsgruppe gelang es z.B., in vitro solche Komplexe herzustellen und mittels Ammoniumsulfatfällung auf ihren Gehalt an verschiedenen Immunglobulinklassen hin zu untersuchen. Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Test sollen nicht nur die Immmunkomplexe in vitro, sondern auch in vivo gemessen werden. Allerdings ist der Test, wahrscheinlich durch die niedrigen Immunkomplexkonzentrationen bedingt, nur schlecht reproduzierbar. Trotzdem werden einige Patientenseren untersucht, um eine Vorstellung darüber zu gewinnen, wie solche Komplexe gebildet werden. Interessant ist, daß vor der Behandlung mit l-Asp in keinem Fall solche Komplexe nachzuweisen sind und die meisten dieser Immunkomplexe 24 bis 48 Stunden nach der l-Asp-Gabe gemessen werden können. Dieses stimmt mit der in vitro gefundenen guten Meßbarkeit der Komplexe bei einer Antigenkonzentration zwischen 5 und 25 E/ml in einem stark antikörperhaltigen Serum überein, die in etwa den Konzentrationen entsprechen, die zu den genannten Zeiten gefunden werden können, wenn man berücksichtigt, daß bei weniger Antikörper in den Seren auch weniger Antigen gebraucht wird, um diesen optimalen Meßbereich zu erreichen.

Um die hier untersuchten spezifischen Immunkomplexe näher zu charakterisieren - hinsichtlich Größe und der Fähigkeit das Komplementsystem zu aktivieren - sollen die Befunde mit den Resultaten von zwei weiteren Immunkomplextesten verglichen werden.

Wie schon berichtet, besteht bei der Präzipitation der Immunkomplexe mit PEG eine Abhängigkeit von der Komplexkonformation und Größe. So werden mit der bei uns benutzten nierdigen PEG Konzentration nur wenige und vor allem große Immunkomplexe präzipitiert, die, wenn sie das Komplementsystem aktivieren, besonders an C1q gebunden sind (Chia et al., 1979). Außerdem werden solche Komplexe besonders in Antikörperüberschuß gebildet. Da keine Korrelation zwischen den gemessenen spezifischen und den PEG präzipitablen Immunkomplexen gefunden werden konnte, kann geschlossen werden, daß die l-Asp-enthaltenden Immunkomplexe vorwiegend in Antigenüberschuß bzw. am Äquivalenzpunkt erfaßt wurden, ein Umstand, der mit in vivo und in vitro Ergebnissen übereinstimmt.

Bei der Aktivierung des klassischen Komplementweges kommt es zur Bildung von C3b aus C3, das sich an Immunkomplexe anlagern kann. Solche Immunkomplexe können zum einen im Serum frei zirkulieren, zum anderen über bestimmte Rezeptoren (C3b/C4b-Rezeptor) an Zellen gebunden werden. Wesentlich erscheint darüberhinaus die Feststellung, daß solche Komplexe nur nach vorangehender Komplementaktivierung gebildet werden können, sie somit ein Parameter für eine abgelaufene Aktivierung des klassischen Komplementweges darstellen. Unklar ist allerdings, in welcher Zeitrelation zur Aktivierung des System sie nachgewiesen werden können und wie stark das Ausmaß einer solchen Aktivierung ist. Von Chia et al. (1979) stammt die Beobachtung, daß solche Komplexe im Gegensatz zu C1q Komplexen kleiner sind und somit nur bei höheren PEG Konzentrationen in dem entsprechenden Test gemessen werden können. Eine Korrelation mit den beiden vorangehenden Testen konnte bei den Patienten nicht nachgewiesen werden, was für den spezifischen Immunkomplextest bedeutet, daß diese Komplexe im allgemeinen nicht zu einer Aktivierung von C3 geführt haben. Überhaupt scheinen die C3b-bindenden Immunkomplexe wenig mit der Behandlung mit l-Asp korrelieren, da sie weder nach den Infusionen gehäuft gefunden werden können, noch ein Anstieg von der ersten zur letzten l-Asp-Gabe nachzuweisen ist. Diese Befunde stehen im Einklang mit denen von Shapiro et al. (1976) und Fabry

et al. (1985), die unter der Behandlung mit l-Asp über eine Synthesehemmung einzelner Komplementkomponenten berichteten. Nur im Zusammenhang mit anaphylaktischen Reaktionen auf l-Asp kann eine Komplementaktivierung beobachtet werden (Fabry et al., 1985)

3. Zusammenhang zwischen den immunogenen Eigenschaften der l-Asp und ihrer Wirksamkeit

Die Bildung spezifischer Immunkomplexe bei Patienten, die unter der Behandlung mit l-Asp-spezifische Antikörper entwickelt haben, wurde schon sehr früh von Petersen et al. (1971) vermutet. Allerdings war der Nachweis solcher Komplexe auf Grund methodischer Schwierigkeiten nicht möglich. Es fiel bei diesen Untersuchungen auf, daß die Formierung spezifischer Antikörper mit einer Reduktion der l-Asp-Spiegel in den Seren der Patienten trotz weiterer Zufuhr einherging. Eine ähnliche Beobachtung machte 5 Jahre später die Arbeitsgruppe um Killander (Killander et al., 1976). Demgegenüber fanden Wahn et al. (1983) verlängerte Halbwertszeiten von l-Asp in Gegenwart der spezifischen Antikörper. Auch sie vermuteten einen Zusammenhang mit der Bildung spezifischer Immunkomplexe. Gestützt wird diese sehr widersprechende Ansicht von Wahn et al. (1983) durch eine weitere Beobachtung von Killander et al. (1976), die bei Patienten mit erhöhten bivalenten Antikörperspiegeln (IgG) vermehrte Remissionsraten fanden.

Um den oben geschilderten Sachverhalt näher aufzuklären, ist es notwendig, zunächst den Nachweis zu erbringen, daß l-Asp in löslichen Immunkomplexen noch eine gewisse funktionelle Aktivität besitzt. Dieses ist den Ergebnissen der in vitro Untersuchungen zufolge sicherlich gegeben. Ähnliche Ergebnisse liegen auch von Khan et al. (1969) vor, die bei der Zugabe von spezifischen Antikörpern zu l-Asp eine Inaktivierung der enzymatischen Akti-

vität bis zu 53% fanden. Interessant in diesem Zusammenhang ist sicherlich auch die Beobachtung, daß die Inaktivierung des Antigens l-Asp durch die spezifischen Antikörper wesentlich stärker ist als diejenige des aktiven Zentrums. Dieser Umstand läßt sich ganz gut damit erklären, daß bei Zufuhr von l-Asp, einem polyvalenten Antigen, verschiedene B-Zellklone aktiviert werden, wobei die einzelnen antigenen Determinanten im l-Asp-Molekül zu einer unterschiedlichen Immunantwort führen. Unter dieser Vorstellung scheint das aktive Zentrum des Enzyms weniger immunogen zu sein, d.h. es werden entweder weniger spezifische Antikörper pro mg Antigen gebildet oder die gebildeten Antikörper haben eine geringere Affinität zu dem Antigen.

Aus den in vitro Untersuchungen kann gefolgert werden, daß l-Asp in löslichen Immunkomplexen zu einem großen Teil noch enzymatisch aktiv ist. Für die Verhältnisse in vivo könnte dieses bedeuten, daß zwei entgegengesetzte Effekte berücksichtigt werden müssen. Zum einen eine verlängerte Eliminationszeit der l-Asp durch die Bildung von Immunkomplexen, zum anderen aber eine teilweise Aufhebung dieses Effektes durch die Inaktivierung durch die Antikörper.

Die in vivo Befunde bei den Patienten sprechen dafür, daß der erste dieser Effekte, d.h. die verlängerte Eliminationszeit überwiegt. Weitere Bedeutung könnte dieser Umstand dadurch erlangen, daß die gebildeten Immunkomplexe in Geweben abgelagert werden, wodurch die Wirksamkeit des Medikamentes potenziert würde, wenn es hierdurch näher an die entsprechenden Zielzellen gebracht würde.

Hinweise auf die Bedeutung der Bildung spezifischer Antikörper und der wie gesehen damit einhergehenden möglichen Bildung spezifischer Immunkomplexe liefern die Untersuchungen von Killander et al. (1976), die bei Patienten mit bivalenten Antikörpern vermehrt Remissionen fanden (67% bei Patienten mit Antikörpern und 27% bei solchen ohne). Eine Untersuchung der von hier erfaßten Patienten hinsichtlich des Zusammenhanges zwischen

Antikörperbildung und Remissionszeiten zeigt ein nicht so eindeutiges Ergebnis. So sind zwar die Antikörperspiegel bei den Patienten, die ein Rezidiv erlitten im Median etwas höher als bei den Patienten in Remission. Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß die Patienten, bei denen keine spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten, in 80% ein Rezidiv erlitten. Außerdem befindet sich das Kind mit den höchsten Antikörperspiegeln in einer jetzt schon ca. 4 Jahre andauernden Zweitremission.

Der Unterschied zu den Beobachtungen von Killander läßt sich sicherlich durch die in der Zwischenzeit erfolgten wesentlichen Therapieänderungen, die zu einer deutlichen Erhöhung der Langzeitremissionsrate geführt haben, erklären. Außerdem ist im Rahmen der heutzutage angewandten Polychemotherapie höchst unwahrscheinlich, daß ein Medikament, das noch nicht einmal am Anfang der sehr eingreifenden Therapie steht, durch eine vielleicht geringgradig erhöhte Wirksamkeit einen so entscheidenden Einfluß auf die Anzahl der Langzeitremissionen auszuüben vermag.

## 4. Allergische Reaktionen auf die Gabe von l-Asp

In der Verghangenheit wurde von verschiedener Seite ein Zusammenhang zwischen der Bildung spezifischer Antikörper und dem Auftreten allergischer Reaktionen auf l-Asp konstatiert (Dellinger et al., 1976, Evans et al., 1982, Fabry et al., 1985, Killander et al., 1976, Petersen et al., 1971, Spiegel et al., 1980). Dabei wurden vorzugsweise IgG und IgM Antikörper untersucht. Nur selten fanden sich IgE Antikörper. Bei letzteren fand sich nur eine geringe Assoziation mit der Klinik.

Dellinger beobachtete bei 33% der Patienten allergische Reaktionen, die im wesentlichen harmlos waren, nur vereinzelt wurden

lebensbedrohliche Reaktionsformen beschrieben. Das Risiko eine allergische Reaktion zu erleiden, stieg mit der Anzahl der verabreichten l-Asp-Infusionen. Bei meinen Patienten kommt es in 8 von 22 untersuchten Kindern zur Ausbildung allergischer Symptome, die in den schwersten Fällen zu Kreislaufkollaps führten. 7 von 8 Patienten besitzen erhöhte IgG Antikörperspiegel, bei 6 dieser 7 Patienten mit erhöhten IgG-Spiegeln kann die Reaktion im wesentlichen durch den Nachweis einer Aktivierung des klassischen Komplementweges erklärt werden. Bei einem der 8 Kinder, das keine erhöhten IgG Antikörperspiegel aufweist, wird die Aktivierung wahrscheinlich durch IgM Antikörper ausgelöst. Bei einem Patienten konnte keine Komplementaktivierung gefunden werden (Daten von Fabry et al., 1985). Bei 3 Patienten mit allergischen Symptomen können erhöhte IgE Spiegel gemessen werden. Bei einem dieser drei Kinder mögen diese Antikörper im wesentlichen für die beobachtete Reaktion verantwortlich gewesen sein, da er keine Aktivierung des Komplementsystems zeigt. Alternativ wäre auch eine durch IgG4 vermittelte Reaktion, ähnlich wie sie für Hämophilie A Patienten auf die Gabe von Faktor VIII Konzentraten von Helmer et al. (1979) beschrieben wurde, denkbar.

Zusammenfassend ergibt sich ein relativ kompliziertes Bild, wobei die Reaktionen in den meisten Fällen durch eine Komplementaktivierung durch IgG bzw. IgM Antikörper erklärt werden kann. Nur in einem Fall kann kein Komplementverbrauch ermittelt werden. Bei diesem Patienten mit erhöhten IgG und IgE Antikörperspiegel könnte die Reaktion entweder durch eine Typ I Reaktion, d.h. die Anlagerung von spezifischem IgE oder aber durch spezifisches IgG4 erklärt werden. Bei zwei weiteren Patienten besteht die Möglichkeit, daß neben einer komplementvermittelten Reaktion auch IgE an der Ausprägung der Symptome beteiligt war.

Interessant sind in diesem Zusammenhang allerdings die Befunde der Immunkomplexuntersuchungen, die bei den Patienten, die eine komplementvermittelte Reaktion erlitten haben, kein eindeutiges Ergebnis erbracht haben. Dieses mag zum einen dadurch zu erklären sein, daß man nicht weiß, wieviele Immunkomplexe notwendig sind,

um eine solche Reaktion auszulösen, d.h. ob die Anzahl überhaupt im Meßbereich liegt, zum anderen ist unklar, wieviele Immunkomplexe während der Reaktion schon aus der Zirkulation verschwinden und in Geweben abgelagert werden, bzw. an bestimmte Zellen gebunden werden.

Weiterhin ungeklärt ist, warum nur einige Patienten mit allergischen Symptomen reagieren, während andere, die z.T. ebenfalls hohe Antikörperspiegel haben, verschont bleiben. Denkbar wäre, daß bei diesen Patienten die Mastzellen durch die vorangehende Chemotherapie im Sinne einer Tachyphylaxie degranuliert worden sind, wodurch die Ausprägung allergischer Zeichen durch die Freisetzung von Histamin auf entsprechende Reize hin, wie z.B. IgE plus Antigen bzw. C3a oder C5a nicht mehr möglich ist. Diese Erklärung ist besonders bei Patienten mit erhöhten IgE Spiegeln ohne Reaktion naheliegend.

Die gerade geschilderte Problematik leitet auch zum nächsten Punkt über - der Vorhersehbarkeit von allergischen Reaktionen. Aus meinen Untersuchungsergebnissen bleibt festzuhalten, daß eine signifikante Beziehung zwischen dem Auftreten allergischer Reaktionen und erhöhten IgG Spiegeln besteht. Leider ist diese Beziehung nicht absolut. Außerdem gibt es, wie eben gesehen, auch noch hiervon unabhängige Reaktionsmöglichkeiten. Andere Prädiktionsmaßnahmen wie z.B. die Vortestung der immunologischen Reaktionslage durch Hautteste oder die Applikation einer intravenösen Testdosis versagen gänzlich, zum einen wegen der zu hohen Rate falsch negativer Resultate, zum anderen, weil durch diese Maßnahmen schon allergische Reaktionen ausgelöst werden können (Evans et al., 1982). Eigene Beobachtungen zu diesem Problem liegen allerdings nicht vor.

Aus den gerade geschilderten Gründen einer nur eingeschränkt möglichen Prädiktion und der Tatsache, daß die beobachteten Reaktionsformen zum Teil lebensbedrohlich für die Patienten waren (Dellinger et al., 1976), erhebt sich die Frage nach anderen Präventivmaßnahmen, wie sie im folgenden ausführlich diskutiert

werden sollen. Dieses ist umso wichtiger, als nach einer Reaktion die Behandlung mit l-Asp abgebrochen werden muß bzw. mit einem anderen Präparat z.B. Erwinia Asp weitergeführt werden muß, wobei allerdings auch gewisse Kreuzreaktivitäten nicht ausgeschlossen werden können (Dellinger et al., 1976).

Vadlamudi et al. (1971) konnten in tierexperimentellen Untersuchungen zeigen, daß die immunogene Wirkung der l-Asparaginase und damit die Bildung spezifischer Antikörper durch die gleichzeitige Verabreichung von Cyclophosphamid unterdrückt werden kann. Ähnliche Ergebnisse lassen sich beim Menschen durch die gleichzeitige Gabe von Prednison und Vincristin erzielen (Evans et al., 1982). In unserer Klinik wird eine hochdosierte l-Asp-Therapie unter der Vorstellung einer Erhöhung der immunsuppressiven gegenüber den immunogenen Eigenschaften des Medikamentes durchgeführt.Weiter soll durch diese Therapieform die Einleitung von Remissionen erhöht werden (Ertel et al., 1979). Die Zahl der beobachteten Reaktionen im Vergleich zu denen in der Literatur angegebenen kann leider nicht gesenkt werden. Für die Zukunft bieten sich zum Teil auf Grund der hier vorgelegten Befunde folgende Möglichkeiten an:

1. Bei einer durch Immunkomplexe ausgelösten Komplementaktivierung, wie sie bei den meisten Patienten erfolgt, ist das Risiko einer solchen Reaktion in der Regel am größten im Bereich des Äquivalenzpunktes. Falls es durch hochdosierte Gabe von l-Asp gelingen würde, die Spiegel während der gesamten Therapiedauer im Antigenüberschußbereich zu halten, so wäre nach der Theorie der Immunkomplexbildung das Risiko einer komplementvermittelten Reaktion innerhalb dieser Zeit sehr gering. Kritische Punkte einer solchen Therapieform wären das Therapieende, zu dem der Antigenspiegel in den Bereich des Antikörperüberschusses sinkt, sowie die Gefahr der Auslösung einer Serumkrankheit. Letzterer Punkt würde eine ständige Überwachung der Patienten in dieser Zeit notwendig machen, wobei allerdings einschränkend gesagt werden muß, daß in den zurückliegenden Jahren der Erfahrung mit l-Asparaginase Behandlung keine Berichte über nephritogene

Wirkungen des Medikamentes bekannt geworden sind. Problematisch bei einem solchen Vorgehen wären dann Patienten, die auch erhöhte IgE Spiegel haben, da durch dieses Vorgehen die Bildung von spezifischen IgE Immunkomplexen nach wie vor möglich ist.

2. Die weitaus elegantere Methode bestünde in der Behandlung der Patienten mit PEG modifizierter l-Asparaginase, die neben hoher Wirksamkeit den Vorteil der geringen Immunogenität (Abuchowski et al., 1984) und sehr geringen Reaktivität mit Antikörpern, die gegen reguläre l-Asp gerichtet sind, hat. Darüberhinaus hat dieses Präparat eine wesentlich verlängerte Halbwertszeit, wodurch es in niedrigeren Dosen angewandt werden kann. Hierdurch sinken auch die toxischen Nebenwirkungen der l-Asp.

Eine dritte Möglichkeit wird durch die Befunde von Irion et al. (1970) angedeutet. Er fand bei der Untersuchung einiger l-Asp Präparationen, daß diese aus verschiedenen Isoenzymen mit unterschiedlicher spezifischer Aktivität zusammengesetzt waren. Falls es gelingen würde, nur diejenigen Enzymanteile zu isolieren, die die höchsten spezifischen Aktivitäten aufwiesen, wäre es prinzipiell möglich, Präparate zu erhalten, die hochaktiv sind und dabei nur in geringem Maße immunogene Begleiterscheinungen haben. Nach den Befunden von Maral et al. (1970) sollen nämlich Präparate mit einer hohen spezifischen Aktivität in weit geringerem Maße die Bildung spezifischer Antikörper anregen. Durch die Auftrennung der Präparate mittels Gelchromatographie können wir keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der spezifischen Aktivität der einzelnen Proteinanteile finden. Somit entfällt wohl diese Möglichkeit, die Behandlung zu verbessern.

Am Rande erwähnt sei noch, daß das Präparat Leunase, das von den Herstellern als weniger immunogenes Medikament angeboten wird, eine deutliche Kreuzreaktivität mit dem von uns benutzten Präparat Crasnitin zeigt.

Für die Zukunft erschient somit der Einsatz von PEG modifizierter l-Asparaginase eine entscheidende Verbesserung in der Behandlung mit l-Asparaginase zu ermöglichen.

Zusammenfassung

L-Asparaginase wird zur Zeit weit verbreitet als erfolgreiches und einziges spezifisches Medikament in der Behandlung maligner Lymphome eingesetzt. Aufgrund seiner Eigenschaften als Fremdprotein besitzt dieses Medikament neben immunsuppressiven Wirkungen im menschlichen Organismus auch immunogene Eigenschaften, wodurch die Bildung spezifischer Antikörper angeregt wird. Diese scheinen zum einen einen Einfluß auf die Pharmakokinetik dieses Medikamentes zu haben, zum anderen können hierdurch allergische Reaktionen provoziert werden.

Es werden 22 Kinder im Alter zwischen 3 und 15 Jahren, die an einer ALL erkrankt sind und nach dem CoALL 82 Protokoll behandelt werden, auf die Bildung spezifischer Antikörper der Klassen IgG, IgM und IgE hin beobachtet. Darüberhinaus werden zu verschiedenen Zeitpunkten nach den l-Asp-Infusionen die enzymatische l-Asp Aktivität, sowie der Antigengehalt im Serum der Patienten bestimmt. Außerdem werden die Patientenseren auf ihren Gehalt an l-Asparaginase enthaltenden IgG Immunkomplexen untersucht, nachdem ein neuer Test erstellt und mittels in vitro Untersuchungen auf seine Spezifizität analysiert worden ist. Darüberhinaus werden die Seren mittels PEG Fällung auf makromolekulare Immunglobuline und mittels solid phase ELISA auf C3b-bindende Immunkomplexe untersucht. Das Auftreten von Antikörpern und Immunkomplexen wird mit der Wirksamkeit der l-Asp und dem Auftreten allergischer Reaktionen bei den Patienten verglichen.

Bei der Mehrzahl der Kinder kommt es zu einer kontinuierlichen Entwicklung spezifischer IgG Antikörper, in einigen Fällen kann auch die Entwicklung von IgM Antikörpern gefunden werden. IgE Antikörper gegen l-Asparaginase kommen nur vereinzelt vor. Erhöhte IgG Spiegel scheinen mit einer verzögerten Elimination von l-Asp einherzugehen. Als Ursache wird die Bildung spezifischer Immunkomplexe in Betracht gezogen, in denen l-Asp

abhängig von der Antigen-Antikörper-Relation enzymatisch aktiv ist. PEG präzipitable Immunkomplexe werden praktisch nicht gefunden, C3b-bindende Immunkomplexe werden ohne Bezug zur l-Asparaginase-Therapie gesehen. Ein eindeutiger Einfluß auf die Remissionszeiten der Patienten in Abhängigkeit der Antikörperspiegel vor der letzten l-Asp-Gabe besteht nicht.

Bei Patienten, die unter l-Asp-Gabe allergische Symptome zeigen, können in 7/8 Fällen erhöhte IgG Antikörperspiegel gefunden werden. Bei 6 dieser 7 Patienten kann die Reaktion durch eine Komplementaktivierung erklärt werden. Bei einem Patienten wird die Komplementaktivierung durch IgM Antikörper ausgelöst. Bei dem 8. Kind wird die Reaktion entweder durch spezifisches IgG4 oder aber durch spezifisches IgE ausgelöst. Bei 2 Patienten können neben erhöhten IgG Spiegeln auch deutlich erhöhte IgE Titer gefunden werden, sodaß bei diesen Kindern die Reaktion neben der Komplementaktivierung auch durch eine Typ I Reaktion ausgelöst sein kann. Mögliche therapeutische Konsequenzen, die sich aus den allergischen Reaktionen ergeben bzw. als Verbesserungsvorschläge möglich wären, werden ausführlich diskutiert.

Laudatio:

Für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und die sachverständige Hilfe bei der redaktionellen Überarbeitung der Dissertation möchte ich Herrn Prof. Dr. U. Göbel, Leiter der Onkologischen Abteilung des Zentrums für Kinderheilkunde der Universität Düsseldorf, recht herzlich danken.

Besonderer Dank gilt auch den Ärzten und Schwestern der Onkologischen Station, KC11, für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Gewinnung der Serumproben.

Für die Überlassung des Themas und die uneingeschränkte Hilfe bei allen aufgetretenen Problemen möchte ich an dieser Stelle ganz besonders Herrn Prof. Dr. V. Wahn, Oberarzt der Abteilung für Neonatologie des Zentrums für Kinderheilkunde der Universität Düsseldorf und Leiter des Immunologischen Labors dieses Zentrums, danken.

Literarturverzeichnis

1. Abuchowski A, McCoy JR, Palczuk NC, van Es T, Davis FF : Effect of covalent attachment of polyethylenglykol on the immunogenicity and circulating live of bovine liver catalase. J. Biol. Chem. 252: 3582 (1977)

2. Abuchowski A, Kazo GM, Verhoest CR, van Es T, Kafkewitz D, Nucci ML, Viau AT, Davis FF: Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylen glycol Asparaginase conjugate.
Cancer Biochem. Biophys. 7: 175 (1984)

3. Atkinson JP, Frank MM: Complement. In: Clinical Immunology I. Parker CW (ed.). p 219, Saunders, Philadelphia, London, Toronto (1980)

4. Bergmeyer: Methoden enzymatischer Analysen. pt 1. Weinheim: Verlag Chemie, p 464 (1974)

5. Bierling R: Experimental investigations of problems of the clinical use of l-Asparaginase. In: Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase RRCP, Springer, Heidelberg. p 115 (1970)

6. Brandslund I, Teisner B, Hole P, Grudzinskas JG, Svehag SE: Complement activation in shock associated with a surgically provoked bacteriaemia.
Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C, 91: 51 (1983)

7. Broome JD: Evidence that l-Asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects.
Nature, 191: 1114 (1961)

8. Broome JD: Evidence that the l-Asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the l-Asparaginase of guinea pig serum in relation to those of antilymphoma substances.
J. Exp. Med., 118: 99 (1963)

9. Broome JD: Evidence that l-Asparaginase of guinea pig is responsible for its antilymphoma effects. II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoided of l-Asparaginase lose their suspectibility to the effects of guinea pig serum in vitro.
J. Exp. Med. 118: 121 (1963)

10. Broome JD: Studies on the mechanism of tumor inhibition by l-Asparaginase.
J. Exp. Med., 127: 1055 (1968)

11. Burchenal JH: A summary of the clinical status of l-Asparaginase. In Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. p. 350 (1970)

12. Campell HA, Mashburn LT: L-Asparaginase EC-2 from E.coli Some substrate specificity characteristics.
Biochemistry 8: 3766 (1969)

13. Carbone PP, Haskell CM, Leventhal BG, Block JB, Salwary OS: Clinical experience with l-Asparaginase. In Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. p 236 (1970)

14. Carpentieri U, Bach MT: Hyperglycaemia associated with the therapeutic use of l-Asparaginase: possible role of insulin receptors.
J. Ped., 93: 775 (1978)

15. Chakrabarty AK, Friedmann H: l-Asparaginase-induced immunosuppression, effects on antibody-forming cells and serum titers.
Science, 167: 869 (1970)

16. Chia D, Barnett EV, Yamagata J, Knutson D, Restivo C, Furst D: Quantitation and characterisation of soluble immune complexes precipitated from sera by polyethylenglykol (PEG).
Clin. exp. Immunol., 372: 399 (1979)

17. Clementi A: La desamidation enzymatique de l-asparagine chez les differentes especes animales et la signification physiologique de sa presence dans l organisme.
Arch. int. Physiol., 19: 369 (1922)

18. Cooper NR, Morrison DC: Binding and activation of the first component of human complement by a lipid region of polysaccharides.
J. Immunol., 120: 1862 (1978)

19. Cooper NR: The complement system. In: Fuldenberg HH, Stites DP, Stobo J, Wells JV (ed.). Basic and clinical immunology. 4 th ed. Lange Medical Publications, Los Altos, CA. p 124 (1982)

20. Creighton WD, Lambert PH, Miescher PA: Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylenglykol.
The Journal of Immunol. 111: 1219 (1973)

21. Czop J, Nussenzweig V: Studies of the mechanism of solubilisation of immune precipitates by serum.
J. Exp. Med., 143: 615 (1976)

22. Daha MR, Fearon DT, Austen KF: C3 Nephritis factor (C3Nef) Stabilisation of fluid phase and cell bound alternative pathway convertase.
J. Immunol. 116: 1 (1976)

23. Day NK, Good RA: Biological amplification systems in immunology Plenum New York (1977)

24. Dellinger CT, Miale TD: Comparison of anaphylactic reactions to l-Asparaginase derived from E.coli and Erwinia cultures. Cancer 38: 1843 (1976)

25. Deutsch E, Fischer M, Frischauf H, Honetz M, Lechner K, Pesendorfer F, Stych H, Weissmann A: Blood coagulation changes und l-Asparaginase therapy. In: Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. p 331 (1970)

26. Dierich MP, Landen B: Complement bridges between cells. J. Exp. Med. 146: 1484 (1977)

27. Digeon M, Laver M, Riza J, Bach JF: Detection of circulating immune complexes in human sera by a simplified assay with polyethylen glykol.
J. Immunol. Methods, 16: 165 (1977)

28. Dohlwitz A, Franzen S, Holgren A, Killander A, Killander D, Wide L, Ahström L: Studies on the antibody formation in patients treated with l-Asparaginase. In: Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical efects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. p 198 (1970)

29. Ehlenberger AG, Nussenzweig V: The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis.
J. Exp. med. 145: 357 (1977)

30. Ehlag KM, Bettelheim KA, Huber TJ: Antibodies to bacterial l-Asparaginase. NZ med. J. 86: 280 (1977)

31. Ellerson JR; Yasmmen D, Painter RH, Dorrington KJ: A fragment corresponding to CH 2 region of immunoglobulin G with complement fixing activity.
FEBS Letters 24: 318 (1972)

32. Evans WE, Tsiatis A., Rivera G, Murphy SB, Dahl GV, Denison M, Crom WR; Barker LF, Mauer AM: Anaphylactoid reactions to E.coli and Erwinia Asparaginase in children with acute lymphocytic leukemia and lymphoma.
Cancer 49: 1378 (1982)

33. Fabry U, Körholz D, Jürgens H, Göbel U, Wahn V: Anaphylaxis to L-Asparaginase durind Treatment for Acute Lymphoblastic Leukemia in Children - Evidence of a Complement-Mediated Mechanism. Pediatric Research 19: 400 (1985)

34. Ghebrehiwet B, Müller-Eberhard H: C3e; an acidic fragment of human C3 with leukocytosis inducing activity.
J. Immunol. 123: 616 (1979)

35. Hall JG: The partitioning of l-Asparaginase between blood and lymph. In: Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg p. 75 (1970)

36. Hamilton-Fairley G, Malpas JS, Galton DAG: Clinical experience with l-Asparaginase. In: Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg, p. 257 (1970)

37. Harkiss GD, Brown DL: Detection of immune complexes by a new assay, the polyethylen glykol precipitating-complement consumption test (PEG-CC).
Clin. Exp. Immunol. 36: 117 (1979)

38. Hoffmann MK; Kappler JW; Hirst JA, Öttgen HF: Regulation of the immune response.
Eur. J. Immunol. 4: 282 (1974)

39. Holland JF, Ohnuma T, Cancer and leukemia Group B investigators: Asparaginase and amino acids in cancer therapeutics.
Cancer Treat. Rep. 65: 123 (1981)

40. Hugli TE, Müller-Eberhard HJ: Anaphylatoxins: C3a and C5a. Adv. Immunol. 26: 1 (1978)

41. Irion E, Arens A: Biochemical characterisation of l-Asparaginase from E.coli. In:Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Sringer, Heidelberg, p. 263 (1970)

42. Jacquillat C, Weil M, Bussel A, Loisel JP, Rousse T, Larrieu MJ, Boiron M, Dreyfus B, Bernard J: Treatment of acute leukemia with l-Asparaginase - preliminary results of 84 cases. In: Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and Clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg. p. 263 (1970)

43. Johnstone A, Thorpe R: Immunochemistry in practice. Blackwell Scientific Publications Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne (1982)

44. Johansen AS, Steensgraad J, Jacobsen C: Comparison between the effects of low molecular weight solvents and polyethylen glykol. Solubility properties of IgG immune complexes. Immunol. 41: 695 (1980)

45. Kalwinsky DK, Urmson JR, Stitzel AE, Sitzer RE: Activation of the alternate pathway of complement in childhood acute lymphoblastic leukemia.
J. Lab. Clin. Med. 88: 745 (1976).

46. Khan A, Hill JM: Neutralizing precipitin in the serum of a patient treated with l-Asparaginase.
J. Lab. Clin. Med. 783: (46 (1969)

47. Kidd JG: Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of a normal guinea pig serum. I.Course of transplanted cancers in various kinds in mice and rats given guinea pig serum horse serum or rabbit serum.
J. Exp. Med. 97: 565 (1953)

48. Killander D, Dahlwitz A, Engstedt L, Franzen S, Gahrton G, Gullbring B, Holm G, Holmgren A, Hölgrund S, Killander A, Kockner D, Mellstedt H, Moe PJ, Palmblad J, Reizenstein P, Skarberg KD, Swedberg B, Uden AM, Wadman B, Wide L, Ahstöm L: Hypersensitve reactions and antibody formation during l-Asparaginase treatment of children and adults with acute lymphocytic leukemia.
Cancer 37: 220 (1976)

49. Klaus GGB, Humphrey JH: The generation of memory cells. I. The role of C3 in the generation of memory cells.

50. Lauenstein K, Grundmann E, Hobik HP, Madaus WP: Experimental immunosuppression with l-Asparaginase. In: Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg, S 170 (1970)

51. Laurell CB: Antigen-Antibody crossed electrophoresis.
Anal. Biochem. 10: 358 (1965)

52. Loeb E, Hill JM, Hill NO, McLellan A, Khan A, Alexander TR, Adachi M: Treatment of acute leukemia with l-Asparaginase. In: Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg, p. 204 (1970)

53. Loos M, Vladmudi S, Meltzer M, Shifrin S, Borsos T, Goldin A: Detection of endotoxin in coomercial l-Asparaginase preparations by complement fixation and separation by chromatography. Canc. Res. 32: 2292 (1967)

54. Lowry OH, Rosebrough NJ, Forr AL, Randall RJ: Protein measurement w Folin reagent. J. Biol. Chem 193: 265 (1951)

55. Mancini G, Carbonara AO, Heremanns JF: Immunochemical quantitation of antigen by single radial immunodiffusion.
Immunochem. 2: 235 (1965)

56. Maral R, Guyonnet JC, Juluo L, de Ratould Y, Werner GH: Studies of the immunosuppressive activity of l-Asparaginase. In: Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, heidelberg, S. 160 (1970)

57. Maral R: Antigenicity of l-Asparaginase and problems of resistance. Experimental study in rabbit and mice. Colloques Internationaux CNRS, No. 197: 395

58. Mashburn LT, wriston JC: Tumor inhibitory effect of l-Asparaginase from E.coli.
Arch. Biochem. 105: 450 (1964)

59. Mashburn LT, Landen LM: Some physicochemical aspects of l-Asparaginase therapy. In: Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase.
RRCR, Springer, Heidelberg, S. 48 (1970)

60. Medicus RG, Schreiber RD, Götze O, Müller-Eberhard HJ:
A molecular concept of the properdin pathway. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, No. 2: 612 (1976)

61. Müller-Eberhard: Complement. Annual Rev. Biochem. 44: 697 (1975)

62. Müller-Eberhard HJ: The serum complement system. In: Textbook of immunopathology. Miescher RA, Müller-Eberhard HJ (ed.).
Grune & Stratton, New York, San Francico, London. S. 45 (1976)

63. Nesbit M, Chard R, Evans A, Karon M, Hammond CD: Evaluation of intramuscular versus intravenous administration of l-Asparaginase in childhood leukemia.
Am. J. Ped. Hematol./Oncol. 1: 1 (1979).

64. Öttgen HF, Old LJ, Boyse EA, Campell HA, Phillips FS, Clarkson BD, Tallal L, Leeper RD, Schwartz MK, Kim JH:
Inhibition of leukemias in man by l-Asparaginase.
Cancer Res. 27, Part I: 2619 (1967)

65. Öttgen HF, Tallal L, Tan CC, Murphy ML, Clarkson BD, Golbey RD, Krakoff IH, Karnofsky DH, Burchenal JH: Clinical experience with l-Asparaginase. In: Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg, p. 219 (1970).

66. Old JL, Boyse EA, Campell HA, Brodey RS, Fidler J, Teller JD: Treatment of lymphosarcoma in the dog with l-asparaginase. Cancer 20: 1066 (1967)

67. Peterson RG, Handschumacher RE, Mitchell MS: Immunochemical responses to l-Asparaginase. J. Clin. Invest. 50: 1080 (1971)

68. Pereira AB, Theofilopoulos AN, Dixon FJ: Detection and partial characterisation of circulating immune complexes with solid phase anti C3. J. Immun. 125: 763 (1980)

69. Platts-Mills TAE, Ishizaka K: activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. J. Immunol. 113: 348 (1974)

70. Porter RR, Reid KBM: Activation of the human complement system by antigen-antibody complexes: the classical pathway. Adv. Prot. Chem. 33: 1 (1979)

71. Pütter J,: Pharmacokinetic behaviour of l-asparaginase in men and in animals. In: Grundman E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg, p. 64 (1970)

72. Ramsey NKC, Coccia PF, Krivit W, Nesbit ME, Edson JR: The effect of l-Asparaginase on plasma coagulation factors in acute lymphoblastic leukemia. Cancer 40: 1398 (1977).

73. Schäffner H, Hädge D: Zur Beeinflussung der humoralen Immunantwort der Maus gegen Proteinantigene mit l-Asparaginase. Allergie und Immunologie 23: 24 (1977)

74. Schwartz MK,: The distribution and clearance of l-Asparaginase In: Grundmann E, Öttgen HF (ed.). Experimental and clinical effects of l-Asparaginase. RRCR, Springer, Heidelberg, p. 58 (1970)

75. Shakib F, stanworth DR: IgG4: a possible mediator of anaphylaxis in a haemophiliac patient. Clin. Aller. 9: 597 (1979)

76. Shapiro R, Youngki K, Michael AF, Gerrard JM, Nesbit ME, Coccia P, Ramsey NKC, Krivit W: L-Asparaginase-induced hypocomplementemia in acute lymphocytic leukemia (ALL) in childhood. AM. J. Ped. Hematol./ Oncol. 1: 5 (1979)

77. Spiegel RJ, Echelberger CK, Poplack DG: Delayed allergic reactions followed intramuscular l-Asparaginase. Med. Ped. Oncol. 8: 123 (1980)

78. Sundsmo JS, Fair DS: Relationships among the complement, kinin, coagulation and fibrinolytic systems. Springer Seminars of Immunopathology 6, No.2/3: 231 (1983)

79. Teisner B, Brandslund I, Grunnet N, Hansen LK, Thellessen J, Svehag SE: Acute complement activation during an anaphylactoid reaction to blood transfusion and the disappearance rate of C3c and C3d from the circulation. J. Clin. Lab. Immunol. 12: 63 (1983)

80. Theofilopoulos AN, Dixon FJ: The biology and detection of immune complexes. Advanc. in Immunol. 28: 89 (1979)

81. Vadlamudi S, Padarathsingh M, Bonmassar E, Waravdekar V, Goldin A: Studies of the neutralisation of l-Asparaginase activity in vitro and in vivo. Cancer 27: 1321 (1971)

82. Verhaegen H, DeCock W, DeCree J, Verbruggen F: Increase of serum complement levels in patients with progressing tumors Cancer 38: 1608 (1976)

83. Voller A, Bidwell D, Bartlett A: Enzyme-linked immunoabsorbtion assay. In: Rose NR, Friedmann H (ed.). Manual of clin. Immunology. Am. Soc. Microbiol. p. 359 (1980)

84. Wahn V: Hereditäre Komplementdefekte. Monatsschr. Kinderkeilkd. 131: 765 (1983)

85. Wahn V, Fabry U, Körholz D, Reinhardt D, Jürgens H, Göbel U: Modified pharmacokinetics of l-Asparaginase from E.coli by formation of specific antibodies to l-Asparaginase of different immunoglobulin classes in children with acute lymphocytic leukemia. Ped. Pharmacol. 3: 303 (1983)

86. Wahn V, Good RA, Gupta S, Day NK: Evidence of persistent IgG-IgA circulating immune complexes in serum of a patient with common variable immunodeficiency: Anaphylactic reactions to intravenous gammaglobulin.
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C, Suppl. 284, 92: 49 (1984)

87. Wehinger H, Fürste HO: Intensivierung der Induktionstherapie der kindlichen lymphoblastischen Leukämie mit l-Asparaginase. Klin. Paediatr. 193: 159 (1981)

88. Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT: Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein 1 H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, No. 9: 3268 (1976)

89. Winkler K, Bero G, Erttmann R, Jürgens H, Göbel U, Gutjahr P, Spaar HJ, Drescher J, Thomas P, Müller-Wickup J, Landbeck G: Therapie der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter. Onkologie 6: 26 (1983)

90. Whelan HA, Wriston JC: Purification and properties of l-Asparaginase from E.coli. Biochem. 8: 2386 (1969)

91. Ziccardi RJ, Cooper NR: Demonstration and quantitation of activation of the first component of complement in human serum. J. Exp. Med. 147: 385 (1978)

92. Ziccardi RJ: Spontanous activation of the first complement component (C1) by an intramolecular autocatalytic mechanism. J. Immunol. 128: 2500 (1982)

Dieter Körholz

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

| | |
|---|---|
| Geburtsdatum | 2. März 1959 |
| Eltern | Dr. med. Roland und Dr. med. Ingeborg Körholz |
| Staatsangehörigkeit | Deutsch |
| Religion | Katholisch |

### Schulischer und beruflicher Werdegang:

| | |
|---|---|
| Grundschule | 1966 - 1969 in Dortmund-Kirchlinde |
| Gymnasium | 1969 - 1978 Bert-Brecht-Gymnasium in Dortmund-Kirchlinde |
| Studium | 1978 Beginn an der Universit Düsseldorf<br>1980 ärztliche Vorprüfung<br>1981 erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung<br>1982 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung<br>1983 dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt |

Beginn der ärztlichen Tätigkeit am 1.1. 85 in der Universiätskinderklinik Düsseldorf.